

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT**

**PAR
ISABELLE DUPONT**

**LA BIODÉGRADATION DU PENTACHLOROPHÉNOL CONTENU DANS LES
BOIS TRAITÉS**

JANVIER 1996

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

A MA FILLE MÉLANIE

REMERCIEMENTS

Ce mémoire est l'aboutissement de trois années de travail. Toutefois, il reflète l'assistance de plusieurs personnes qui m'ont aidée à surmonter les difficultés de mon projet de recherche. A ce titre, je désire remercier tout particulièrement mon directeur de recherche, M. Claude Daneault, pour sa supervision constante de mon projet et pour sa très grande disponibilité et sa compréhension.

Je remercie sincèrement M. Sylvain Robert pour m'avoir aidée à la compréhension de certaines notions scientifiques et pour sa disponibilité.

Finalement, j'offre toute ma reconnaissance aux personnels du Centre de recherche en pâtes et papiers pour leur support sur le plan technique et spécialement à M. Jimmy Prasakis pour ses judicieux conseils et son aide aux moments opportuns.

RÉSUMÉ

Les vieux bois traités que sont, entre autre, les poteaux de lignes téléphoniques âgés d'une soixantaine d'années, représentent des déchets solides dangereux. Dans le cadre de ce projet, nous avons en premier lieu transformé ces poteaux de pin gris imprégnés d'une solution de pentachlorophénol (PCP) en pâte thermomécanique (PTM). Cette modification nous a permis d'appliquer plus efficacement la biotechnologie et, ainsi vérifier deux phénomènes biologiques distincts soit la biodégradation du PCP contenu dans la pâte imprégnée et le blanchiment biologique de ce même type de pâte non imprégnée. La dégradation biologique du PCP et de son solvant (une huile légère de pétrole) a été effectuée par l'utilisation de deux cultures mixtes acclimatées, sous des conditions d'aération, avec leur milieu nutritif respectif contenant chacun un activateur. L'oxydation biologique s'est effectuée avec trois bioréacteurs contenant des masses croissantes de pâte contaminée au PCP, ayant une consistance d'environ 6 %. La méthode utilisée pour suivre la biodégradation du PCP dans la pâte contaminée, a été la chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à capture d'électron. Pour mieux quantifier la détoxication, les filtrats aqueux de chaque aliquot de pâte ont été caractérisés pour leur contenu en matière organique carbonée chimiquement oxydable, en carbone inorganique, de même que pour leur niveau de toxicité par bioessai de toxicité Microtox. Le blanchiment par voie biologique, s'est effectué sous les mêmes conditions que celles employées pour la biodégradation du PCP. Un bioréacteur aérobique en mode cuvée a été utilisé avec une quantité de pâte de pin gris (PTM) dénuée d'imprégnant. La capacité des microorganismes à blanchir la pâte, a été évaluée en déterminant la blancheur ISO et la quantité d'acides gras et résiniques (AGR) présents dans la pâte. Les résultats de biodégradation montrent que les deux consortiums bactériens sont capables de convertir l'halophénol à plus de 90 %. Ils maintiennent la même performance de biodégradabilité même après avoir quadruplé la quantité de PTM à biotraitier, tout en réduisant la biomasse de cinq fois. La caractérisation de la phase aqueuse par analyse spectroscopique montre la capacité des communautés

microbiennes à dégrader la solution de PCP jusqu'à la minéralisation d'une partie de la matière organique. Elle est cependant, très toxique et son niveau de toxicité augmente avec l'évolution du processus de biodégradation. Pendant la période de 21 jours de biotraitement, le niveau de toxicité s'est maintenu élevé. Les résultats montrent qu'à l'aptitude des deux communautés bactériennes à biodégrader le PCP, s'ajoute la possibilité de blanchir une PTM de pin gris non imprégnée jusqu'à un niveau de blancheur de 68 % ISO et de réduire la teneur en acides gras et résiniques (AGR) de la pâte. Etant donné que les AGR sont responsables en partie de la coloration jaune de la pâte, leur réduction peut contribuer à un éclaircissement de celle-ci. Les résultats obtenus montrent qu'on peut fabriquer une pâte thermomécanique à partir de bois traité biodécontaminé. Il est également possible d'accroître le niveau de blancheur d'une PTM de pin gris. La pâte biodécontaminée peut servir à la fabrication de carton.

Mots clés. Pentachlorophénol, bioréacteur, pâte thermomécanique, aérobiose, blanchiment, acides gras et résiniques, chromatographie en phase gazeuse, toxicité

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	iv
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS	xiv
CHAPITRE I INTRODUCTION	1
CHAPITRE II CONSIDÉRATIONS THÉORIQUES	4
2.1 Identité et caractéristiques physico-chimiques du pentachlorophénol	4
2.1.1 Toxicité et impact	7
2.2 Le traitement du bois au pentachlorophénol	10
2.2.1 Réglementation	13
2.3 Biotechnologie	13
2.4 Biodégradation du pentachlorophénol	15
2.5 Détermination quantitative du pentachlorophénol	20
2.5.1 Chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à capture d'électron	23
2.5.1.1 La chromatographie de partition gaz-liquide capillaire	23
2.5.1.2 La phase stationnaire	24
2.5.1.3 Système chromatographique	28
2.5.1.4 Injecteur "split-splitless"	28
2.5.1.5 Détecteur à capture d'électron	31
2.6 Détermination quantitative de la matière organique et inorganique. des milieux aqueux et leur toxicité	32

2.6.1	La demande biochimique en oxygène (DBO ₅).....	33
2.6.2	La demande chimique en oxygène (DCO).....	36
2.6.3	La mesure des carbones organiques totaux (COT)	36
2.6.4	La toxicité	38
2.7	Principe de fabrication d'une pâte thermomécanique.....	39
2.7.1	Le blanchiment des pâtes mécaniques.....	42
2.8	Détermination quantitative des acides gras et résiniques (AGR) par chromatographie capillaire de partition gaz-liquide avec spectromètre de masse.....	42
CHAPITRE III	MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES	45
3.1	Préparation de l'échantillon.....	45
3.1.1	Mise en pâte du bois traité au PCP.....	45
3.2	Biotraitement de la pâte thermomécanique de pin gris imprégnée de PCP.....	45
3.2.1	Dosage de l'oxygène dissout (OD).....	52
3.2.2	Dosage de l'azote	52
3.2.3	Dosage du phosphore.....	53
3.3	Détermination des chlorophénols par chromatographie capillaire de partition gaz liquide.....	54
3.4	Extraction du PCP à partir d'un solide	58
3.5	Extraction du PCP à partir d'un liquide	59
3.6	Analyse qualitative par CGL/SM d'échantillons de PCP extrait	62
3.7	Analyse quantitative par CGL/DCÉ d'échantillons de PCP extrait	64
3.8	Caractérisation des filtrats aqueux des aliquots de pâte par analyses spectroscopiques et par méthode électrométrique.....	65

3.8.1	Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO) des filtrats aqueux.....	66
3.8.2	Détermination de la demande biologique en oxygène (DBO ₅) des filtrats aqueux	66
3.8.3	Détermination du carbone total (CT), du carbone organique total (COT), du carbone inorganique (CI) et du carbone organique non purgeable (CONP) des filtrats aqueux.....	67
3.8.4	Bio-essais de toxicité Microtox des filtrats aqueux.....	67
3.9	Blanchiment par voie biologique de la PTM non imprégnée.....	68
3.9.1	Mesure de la blancheur ISO sur la pâte blanchie biologiquement.....	69
3.9.2	Extraction des acides gras et résiniques (AGR) à partir d'un liquide	69
3.9.3	Extraction des acides gras et résiniques (AGR) à partir d'un solide	69
3.9.4	Dosage des acides gras et résiniques (AGR) de la pâte blanchie biologiquement par CGL/SM.....	71
CHAPITRE IV	RÉSULTATS ET DISCUSSION	74
4.1	La méthode de séparation des chlorophénols par CGL/DCÉ.....	74
4.2	La biodégradation du PCP dans le bois traité.....	79
4.2.1	La dégradation biologique du PCP dans une PTM de pin gris provenant de poteaux de lignes téléphoniques traités	81
4.2.2	La caractérisation des filtrats aqueux correspondant aux échantillons de pâte	93
4.3	Blanchiment biologique d'une PTM de pin gris non imprégnée	101

CHAPITRE V	CONCLUSION	106
CHAPITRE VI	BIBLIOGRAPHIE.....	108

LISTE DES TABLEAUX

2.1	Caractéristiques physico-chimiques du PCP.....	6
3.1	Conditions d'opération de raffinage.....	46
3.2	Conditions d'opération du biotraitement appliqué sur la PTM de pin gris imprégnée de PCP.....	47
3.3	La description des deux inoculums et de leurs milieux nutritifs	50
3.4	Seuils de toxicité des composés et éléments toxiques pour les populations bactériennes utilisées dans la biodégradation du PCP	51
3.5	Les standards externes de chlorophénols, le standard interne (SI) et le traceur.....	55
3.6	Conditions chromatographiques par CGL/DCÉ lors de l'étalonnage.....	57
3.7	Conditions chromatographiques par CGL/SM pour l'identification du PCP.....	63
3.8	Conditions chromatographiques par CGL/SM pour la quantification des AGR.....	73
4.1	Détermination des Tr et des FRR des composés chlorophénoliques d'étalonnage et du traceur.....	76
4.2	La concentration de PCP dans le pin gris traité.....	80
4.3	Les concentrations en acides gras et en acides résiniques après différents temps de biotraitement.....	104

LISTE DES FIGURES

2.1	Structure chimique du pentachlorophénol (PCP)	5
2.2	Structure chimique du pentachlorophénate de sodium (PCP-Na).....	8
2.3	La voie métabolique proposée dans la dégradation anaérobie du PCP par des boues municipales acclimatées.....	16
2.4	Les voies métaboliques potentielles de la dégradation aérobie du PCP	17
2.5	Réaction catalysée par l'enzyme PCP déhalogénase de la souche ATCC33790 <i>Arthrobacter</i> sp	19
2.6	Site actif de l'enzyme.....	21
2.7	Les composantes d'une colonne capillaire	25
2.8	Structure du diphenyldiméthylpolysiloxane.....	26
2.9	Principe de fabrication de la pâte thermomécanique (PTM)	41
3.1	Point d'échantillonnage de la solution biphasique	61
3.2	Extraction des acides gras et résiniques à partir d'une PTM de pin gris ..	70
4.1	Le chromatogramme des standards externes de chlorophénol par CGL capillaire/DCÉ	75
4.2	Le chromatogramme du total des ions (CTI) par CGL capillaire/SM d'un échantillon de PCP extrait de la pâte.....	84
4.3	Le spectre de masse du PCP extrait	85
4.4	Variation de la concentration de PCP dans la pâte (Bioréacteur #1)	89
4.5	Variation de la concentration de PCP dans la pâte (Bioréacteur #2)	91
4.6	Variation de la concentration de PCP dans la pâte (Bioréacteur #3)	92
4.7	Variation de la concentration de PCP dans les filtrats aqueux (Bioréacteurs #2 et #3).....	94
4.8	Constituants organiques et inorganiques des filtrats aqueux (Bioréacteur #2).....	95

4.9	Constituants organiques et inorganiques des filtrats aqueux (Bioréacteur #3).....	96
4.10	Toxicité des filtrats aqueux (Bioréacteurs #2 et #3)	100
4.11	Blanchiment par voie biologique d'une PTM de pin gris (Bioréacteur #4)	102

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

ACA	ammoniaque-cuivre-arsenic
BSTFA	N-O-bis-triméthylsilyltrifluoroacétamide
CCA	chrome-cuivre-arsenic
CG	chromatographe en phase gazeuse
CGL	chromatographie en phase gaz-liquide
CI	carbone inorganique
CLHP	chromatographie liquide à haute pression (ou performance)
COD	carbone organique dissous
CONP	carbone organique non purgeable
COP	carbone organique purgeable
COT	carbone organique total
CP	chlorophénol
CT	carbone total
CTI	chromatogramme des ions totaux
DBO ₅	demande biochimique en oxygène
<i>p</i> -DCB	<i>para</i> -dichlorobenzène
DCÉ	détecteur à capture d'électron
DCM	dichlorométane
DCO	demande chimique en oxygène
DDPC	dibenzoparadioxine polychlorée
DFPC	dibenzofuranne polychloré
DIO	demande immédiate en oxygène
DIRN	détecteur infrarouge non dispersif
DTO	demande totale en oxygène
EC ₅₀	concentration effective à inhiber 50 % de la population bactérienne de l'essai de toxicité

I ₅	incubation durant un temps t = 5 min.
I ₁₅	incubation durant un temps t = 15 min.
I ₃₀	incubation durant un temps t = 30 min.
IE	impact électronique
MES	matières en suspension
MCP	monochlorophénol
OCCD	octachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
OD	oxygène dissous
PCP	pentachlorophénol
PTM	pâte thermomécanique
SI	standard interne
SM	spectromètre de masse
TBME	<i>tert</i> -butyl méthyl éther (oxyde de méthyle et de <i>t</i> -butyle ou 2-méthoxy-2-méthylpropane)
2,4,6-TBP	2,4,6-tribromophénol
TCP	trichlorophénol
TTCP	tétrachlorophénol
T _R	temps de rétention

CHAPITRE I

INTRODUCTION

En 1936, la compagnie américaine Dow and Monsanto Chemical introduisait le pentachlorophénol (PCP). A cause de sa grande disponibilité et de son prix très avantageux , il a été de plus en plus utilisé et ce, à différentes fonctions dans plusieurs pays du monde. Son utilité principale dans l'industrie du bois est celle d'agent de préservation (80 %). Les produits traités au PCP sont principalement les poteaux de lignes téléphoniques et électriques et les traverses de voies ferrées. Il est donc devenu le produit d'imprégnation privilégié pour une grande variété d'autres produits à usage spéciaux, comme les poteaux garde-fous, les poteaux indicateurs, les murs de soutènement (1). Il est également utilisé comme agent antimicrobien dans les systèmes de refroidissement industriels, dans l'emballage alimentaire, en tant qu'ingrédient actif principal des teintures et des peintures extérieures. On le retrouve dans les produits destinés aux soins dentaires (2), dans les savons anti-bactériens, dans les produits médicaux dermatologiques (3) et comme biocide agricole.

Les plus grands utilisateurs de PCP au Canada, sont les industries de préservation du bois. On effectue le traitement du bois au PCP pour une raison économique: on épargne ainsi certaines essences spécifiques.

Le traitement du bois au PCP s'effectue par imprégnation sous pression. La solution de PCP va pénétrer dans le bois à une profondeur suffisante pour garantir une résistance microbienne à long terme. L'idée de protéger le bois n'est pas récente. A travers l'histoire de la préservation du bois au moyen de substances chimiques, il est possible de remonter aussi loin que 4000 ans. Les égyptiens se servaient de bitume pour traiter les chevilles de bois servant à l'assemblage de la maçonnerie des temples (4). Sous l'empire romain, le goudron, l'huile de lin, l'huile de cèdre et des mélanges d'ail et de vinaigre servaient à la préservation des statues de bois. Alexandre le Grand aurait

ordonné que les piliers et autres poutres utilisés dans la construction de pont soient recouverts d'huile d'olive pour les protéger contre la pourriture (5).

De nos jours on emploie le PCP car il possède une grande stabilité chimique et biologique, une bonne résistance aux attaques microbiennes et par conséquent il assure au bois traité une durée de vie de plusieurs décennies (6). C'est pourquoi, entre autre, Bell Canada et Hydro Québec l'utilisent.

Une fois devenus inutiles, soit après une soixantaine d'années, les poteaux de lignes téléphoniques sont acheminés vers des sites d'enfouissement ou destinés à l'incinération à haute température. Ces procédés n'éliminent pas pour autant ces déchets solides dangereux car leur incinération génère des sous-produits toxiques et leur enfouissement est coûteux (7).

Le PCP est un composé organochloré et une substance xénobiotique (substance synthétisée par l'homme). Il est difficilement biodégradable car les liaisons carbone-chlore sont difficiles à rompre (8). Le PCP est donc un composé *persistant* dans l'environnement et son usage abusif engendre un problème de pollution de plus en plus urgent au niveau du sol, de l'eau et de l'air. Étant donné la grande consommation du PCP dans l'industrie de préservation du bois, les cours d'eau à proximité de ces bois traités en sont contaminés, ainsi que le sol des sites d'entreposage. À la suite du traitement sous pression, le bois imprégné est entreposé à l'air libre. La température, les vents ainsi que de l'humidité agissent sur les propriétés d'évaporation du PCP (9), l'air ambiant en est vite chargé. En plus de ses applications protectrices, le PCP se forme durant le processus de chloration lors d'un blanchiment au chlore d'une pâte chimique, on le retrouve donc dans les effluents de certaines industries de pâtes et papiers (10,11). Les eaux potables municipales suite à une chloration pour le traitement de ces eaux sont également sujettes à la formation de PCP. L'homme a ainsi entraîné des traces de PCP dans certains

endroits, par exemple dans un grand nombre d'affluents de chacun des Grands Lacs (12). Le PCP est un composé *omniprésent*.

L'utilisation abusive et inadéquate de ces produits, comporte des risques pour les utilisateurs et la population en général, en plus des répercussions ci-haut mentionnées sur l'environnement.

Les principaux objectifs du projet de recherche sont:

1. Produire une pâte à haut rendement avec du bois traité de pin gris
2. Traiter biologiquement l'effluent de la pâte
3. Traiter biologiquement la pâte thermomécanique de pin gris imprégnée de PCP
4. Traiter biologiquement une pâte thermomécanique de pin gris sans PCP

Le traitement biologique est appliqué dans le but de vérifier deux phénomènes biologiques distincts. La première partie du projet de recherche consiste à suivre la biodégradation du PCP contenu dans la pâte imprégnée. L'efficacité du système est estimée par analyses chromatographiques et spectroscopiques. La deuxième partie consiste à suivre le processus de blanchiment par voie biologique sur la pâte non imprégnée.

L'efficacité du traitement biologique, nous permettra d'apporter une solution au problème d'élimination d'un déchet solide dangereux.

Les pâtes décontaminées pourront être utilisées dans diverses formulations de carton.

CHAPITRE II

CONSIDÉRATIONS THÉORIQUES

Ce chapitre vise à approfondir les connaissances requises pour la bonne compréhension du processus de dégradation biologique d'un composé toxique organochloré. Les méthodes de quantification effectuées pour suivre les deux phénomènes biologiques sont également décrites.

2.1 Identité et caractéristiques physico-chimiques du pentachlorophénol

Le PCP est un pesticide de la famille des phénols polychloré (figure 2.1). Les pesticides sont des produits destinés à assurer la destruction ou à prévenir l'action des animaux, des végétaux, des microorganismes ou des virus nuisibles. Ils comprennent les insecticides, les rongicides, les herbicides, les fongicides et les hélicides (molluscicides) (13,14).

Les propriétés physico-chimiques du PCP doivent être prises en considération dans l'établissement des méthodes de manutention et de mesures d'intervention. Le tableau 2.1 présente les propriétés physiques du PCP (15,16).

Le PCP est un exemple de substance xénobiotique c.-à-d. une substance synthétisée par l'homme et peu biodégradable (8) Ce composé organochloré est habituellement synthétisé de deux façons, soit par chloration directe de l'anneau phénolique avec du chlore gazeux en présence de AlCl_3 agissant comme catalyseur, ou par hydrolyse alcaline de l'hexachlorobenzène (17). Le PCP est solide à la température de la pièce et de couleur brunâtre à blanc lorsqu'il est pur. Il forme des vapeurs toxiques à haute température, soit supérieure à 350 °C. Le seul moyen jusqu'à présent de détruire le PCP est l'incinération à des températures de 1000 °C et plus (12). L'incinération du bois traité au PCP est une source d'émission de dibenzo-*p*-dioxines polychlorées et de dibenzo-furannes polychlorés (DDPC/DFPC) (14,15). Sa pression de vapeur

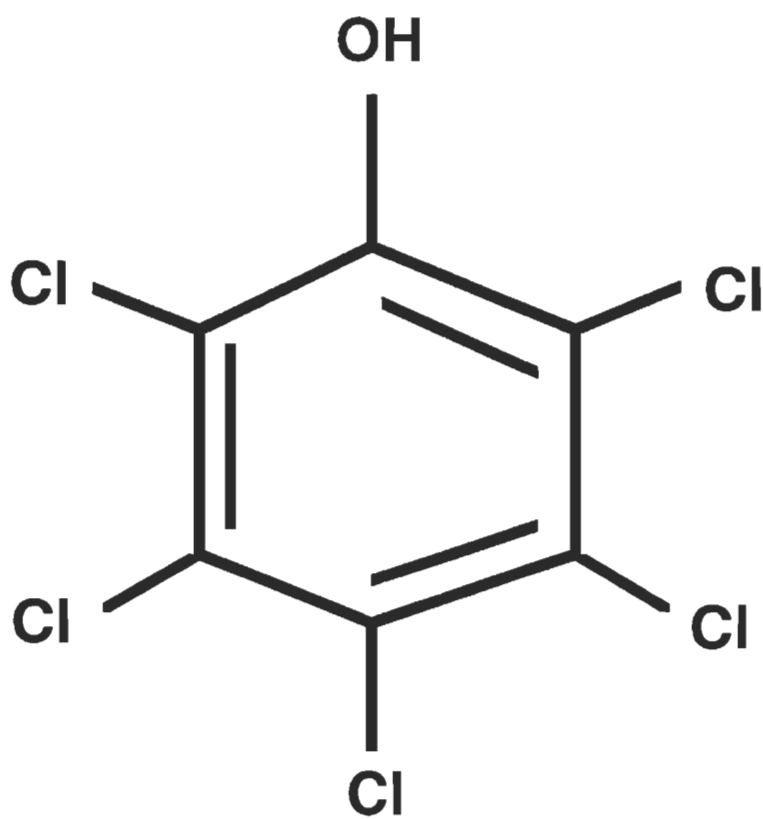


FIGURE 2.1 Structure chimique du pentachlorophénol (PCP)

**TABLEAU 2.1 Caractéristiques physico-chimiques du PCP
(Williams 1982, Steiert 1987)**

Poids moléculaire	266.35
densité	1.978 g / cm ³ (22 °C)
Point de fusion	191 °C
Point d'ébullition (760 mm Hg)	310 °C
Pression de vapeur	1.6 (10 ⁻⁴ mm Hg (25 °C) 1.2 (10 ⁻¹ mm Hg (100 °C) 40 mm Hg (211 °C)
Solubilité dans l'eau	20 ppm (30 °C)
Solubilité du sel sodé dans l'eau	33 g / 100 g (25 °C)
Réfraction molaire	53.5
pK_a	4.71
Coefficient de partage (K_p), 25 °C dans hexane-eau et octanol-eau	1.03 * 10 ⁵ (log K _p 5.01)

bien que faible à la température de la pièce, entraîne une légère sublimation du PCP (12).

Le PCP est un composé organique stable et ne se décompose pas lorsqu'on le chauffe à des températures au-dessous de son point d'ébullition (310°C). Il se dissout facilement dans les solvants organiques non polaires (huiles), les graisses et les cires. Conséquemment chez l'être humain nous sommes dotés de lipides cutanés; ce qui accroît la capacité du PCP à pénétrer dans la peau après un contact dermique. Sa nature hydrophobe et ses autres propriétés facilitent son absorption au niveau de l'intestin (14). Le PCP est aussi un acide faible. Il est relativement peu soluble dans l'eau, surtout à pH légèrement acide ($\text{pKa } 4.7$) (18). Mais sa dissolution augmente avec le pH et la température, il est alors sous forme de sel, tel le pentachlorophénolate de sodium (figure 2.2).

Le PCP de grade technique contient plusieurs contaminants, particulièrement les DDPC et les DFPC (13,14,19).

2.1.1 Toxicité et impact

À cause de son utilité à large spectre, la population en général et les divers biotes sont exposés au PCP.

L'évaporation peut être une source importante de perte de PCP à partir de l'eau et des surfaces du sol aussi bien que du matériel traité au PCP. Le traitement par imprégnation des poteaux peut conduire à la perte de 30 à 80 % de PCP, due à l'évaporation, à l'intérieur de 12 mois (20,21). La température, la vitesse des vents et l'humidité affectent sont les facteurs qui affectent l'évaporation du PCP. D'ailleurs pour réduire le taux d'évaporation du PCP, la préparation chimique contient la plupart du temps un cosolvant (9). La solubilité du PCP dans l'eau sous sa forme ionisée a conduit à une contamination répan-

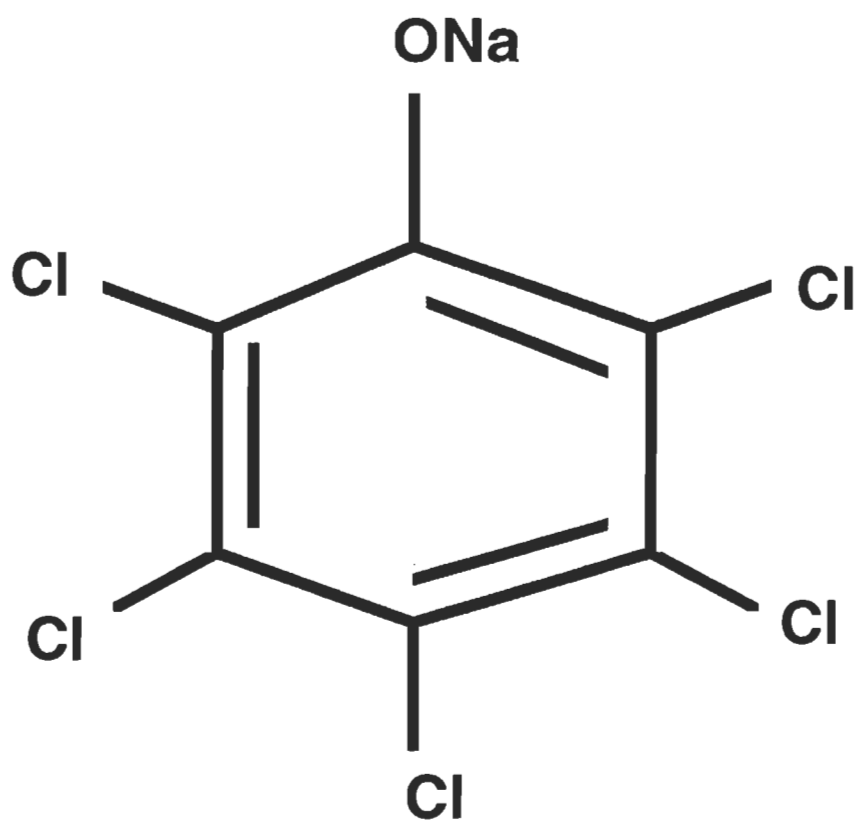


FIGURE 2.2 Structure chimique du pentachlorophénolate de sodium (PCP-Na)

due dans l'environnement. Le degré d'adsorption d'un pesticide gouverne sa biodisponibilité dans le sol; par conséquent le taux de dégradation et l'activité biocidale (l'agent tue les microorganismes et les insectes ravageurs) sont réduits par de fortes adsorptions. L'adsorption du PCP est maximale dans des sols fortement acides et nulle dans des sols neutres. L'adsorption et le lessivage du PCP varie donc d'un sol à l'autre. Le PCP est plus mobile dans les sols minéraux, et moins mobile dans l'argile acide et les sols sablonneux.

Le lessivage est un moyen de transport du PCP. De l'adsorption et du comportement de lessivage du PCP, on peut conclure que la matière organique sert de compartiment d'emmagasiner réversible, permettant une désorption de PCP d'un sol à contenu élevé en eau et, de là, l'accumulation de PCP dans le sol, et éventuellement dans l'eau souterraine. Le PCP ne se lessive pas rapidement à partir du bois traité.

Lors de la transformation du PCP, il y a dégradation abiotique et biotique de celui-ci. Le PCP et son sel se dégradent abiotiquement par photochimie dans l'eau, dans les solvants organiques et sur les surfaces solides (19). Le taux de photodécomposition augmente avec l'augmentation du pH, ce qui préconise un mécanisme ionique. Le PCP solide ou dissous dans l'eau peut être photolysé par la lumière en quelques jours, produisant des fragments aromatiques (phénols plus faiblement chlorés), non aromatiques, du chlorure d'hydrogène (HCl) et du dioxyde de carbone (CO₂).

Il y a également une dégradation biotique dépendante de la quantité de matière organique, de l'humidité et de la température par les microorganismes. Certains champignons sont capables d'attaquer le PCP (13). Il peut y avoir également une dégradation par les plantes: c'est le cas des rizières où il y a absorption du PCP.

Le PCP n'est pas toxique seulement pour les microorganismes et pour les plantes, mais aussi pour les animaux. Le PCP est un produit de synthèse qui possède un potentiel immunomodulateur c.-à-d. qui a un effet sur le système immunitaire. Les mammifères exposés directement au PCP, sont susceptibles de posséder dans leur organisme des quantités variables du produit. Les gens des sociétés industrialisées sont généralement contaminés au PCP. Les sources probables d'exposition humaine au PCP sont: la chaîne alimentaire (phénomène d'amplification biologique), le contact direct avec les produits du bois traité; de même que les autres produits dans lesquels le polluant synthétique est ajouté. Ainsi les individus les plus contaminés au monde sont les japonais, les canadiens, les américains et finalement les allemands (14). L'élimination du PCP par le corps se fait via l'urine ou les excréments. La DL_{50} chez le rat est de 200 mg/kg par voie orale et de 300 à 350 mg/kg par voie cutanée. La toxicité du PCP pour toute forme de vie, est due, en partie, à son action inhibitrice sur la phosphorylation oxydante (16).

2.2 Le traitement du bois au pentachlorophénol

La préservation du bois se fait par imprégnation, sous pression ou par procédé thermique, de substances chimiques dans le bois à une profondeur qui garantie une résistance à long terme. La préservation du bois permet d'utiliser des arbres plus petits et à croissance plus rapide.

Aujourd'hui le choix des produits de préservation dépend de l'espèce à traiter, de l'emploi auquel ils sont destinés, des propriétés de la substance ou de la préparation chimique. Les produits de préservation du bois doivent posséder certaines caractéristiques telles que: être toxiques pour les organismes qui attaquent le bois, être capables de pénétrer le bois et ne pas affaiblir la résistance de ce dernier, ne causer aucune variation importante des dimensions du bois. La résistance au feu, la couleur, l'odeur, et la possibilité de lessivage hors du bois complètent les caractéristiques. Au Canada on se sert

principalement de quatre préparations chimiques: (a) chrome-cuivre-arsenic (CCA); (b) ammoniacque-cuivre-arsenic (ACA); (c) créosote et (d) pentachlorophénol (PCP) (12). Au Québec, on compte environ deux millions de poteaux de bois servant à la distribution de l'électricité et au service téléphonique. La plupart d'entre eux sont imprégnés avec des additifs chimiques. Les deux principaux traitements de fibres de bois sont le PCP et le CCA. Ils se distinguent par leur couleur, brune pour le premier, verte pour le second (22).

La qualité du PCP commerciale est régie par la norme 080 de l'ACNOR sur la préservation du bois ("Wood Preservation"), qui elle, renvoie à la norme AWP A P-8 de "l'American Wood Preservers Association" intitulée "Oil-Borne Preservatives". Le PCP utilisé pour l'imprégnation du bois est de grade technique, il contient environ 10 % de chlorophénols connexes. Certaines impuretés comme les octa-, hepta- et hexachlorodibenzoparadioxines et les chlorodibenzofurannes, sont également présents. Le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzoparadioxine; produit hautement toxique n'a pas été retrouvé dans le pentachlorophénol.

Aux fins de l'imprégnation du bois, le pentachlorophénol est dissout dans une huile dérivée du pétrole conforme à la norme 080.201 de l'ACNOR intitulée "Standard For Hydrocarbon Solvents for Preservatives". Les huiles utilisées habituellement ont un point d'éclair supérieur à 66 °C (1). L'huile légère de pétrole employée pour l'imprégnation sous pression, entre autre, des poteaux de lignes téléphoniques et électriques, est commercialement appelée "P9-OIL". Les concentrations de la solution d'imprégnation au PCP se situent entre 3 % et 7 % selon le produit de bois et l'essence à imprégner. Dans le cas des poteaux de lignes téléphoniques et électriques au Québec, la compagnie Domtar prépare une solution de 5 à 6 %. A cause de l'évaporation du PCP dans l'air ambiant à partir du bois traité, on utilise non pas un solvant mais un

système de solvants transporteurs qui réduit le niveau d'évaporation de PCP (9). Le taux de rétention chimique dans le bois est de $6,4 \text{ kg/m}^3$, ce qui est moins de 1 % du poids du bois.

Le bois imprégné de PCP est de couleur brun pâle à brun foncé, selon l'huile utilisée. Cette couleur se transforme habituellement en un agréable gris argent par suite de l'exposition aux intempéries et du vieillissement normal. A cause de la nature huileuse du produit, le bois imprégné devient hydrofuge, ce qui améliore la stabilité dimensionnelle et réduit les fissures. Il devient également résistant à l'usure mécanique. L'huile retarde la corrosion des attaches métalliques et réduit la conductibilité électrique du bois. Elle lubrifie ce dernier, ce qui facilite la pénétration des crampons lorsque l'on doit monter dans les poteaux.

Le PCP solide est mélangé avec l'huile de pétrole pour obtenir la solution de traitement. La préservation du bois se fait par son imprégnation sur plusieurs centimètres de profondeur, le traitement sous pression, qui s'effectue dans des cylindres sert à réaliser la fixation du PCP dans le bois.

Avant l'application du mélange, on réduit l'humidité du bois par séchage à l'air, ou séchage au four ou dans le cylindre d'imprégnation. Le produit de préservation est appliqué dans un autoclave pouvant atteindre 45 m de longueur et 2 m de diamètre. Les paramètres de traitement, telle la température, la pression, la durée dépendent de l'essence de bois, de la nature du produit désiré et de l'humidité initiale du bois.

Après le conditionnement, le PCP en solution est appliqué au moyen du procédé à cellule vide. Dans ce procédé on se sert de l'air inclus dans les cellules du bois pour limiter la rétention de la solution de préservation. Le procédé à cellules vides permet d'imprégner le bois avec une quantité

suffisante de PCP et de réduire au minimum l'exsudation à long terme de la solution de préservation, qui est une caractéristique désagréable dans le cas des poteaux.

Le bois traité est retiré de l'autoclave puis déposé sur une plate-forme d'égouttement qui retient l'excédent, par la suite le bois traité est stocké sur une aire prévue à cette effet (12).

2.2.1 Réglementation

Les lois et règlements fédéraux et provinciaux qui régissent l'emploi, le transport et l'élimination du PCP.

Lois fédérales.

1. Loi sur les pêcheries
2. Loi sur les contaminants de l'environnement
3. Loi sur les produits antiparasitaires
4. Loi sur l'immersion de déchets en mer
5. Loi sur le transport des marchandises dangereuses
6. Loi sur la lutte contre la pollution atmosphérique

Lois provinciales (Québec)

1. Loi de la qualité de l'environnement
2. Loi sur la santé et la sécurité au travail
3. Code de la sécurité routière (12)

2.3 Biotechnologie

Pour des fins de décontamination, les recherches ont convergé, depuis quelques années vers la biotechnologie c.-à-d. vers l'utilisation de microorganismes, dégradeurs de composés organochlorés.

Les premières décompositions microbiennes ont été rapportées par Kirsch et Etzel (23). La littérature rapporte des travaux où la capacité à

dégrader le PCP a été démontrée avec une variété de cultures de microorganismes afin de restaurer les sols et décontaminer les eaux. Certains auteurs ont montré l'efficacité de la biodégradation des polluants organochlorés en utilisant des monocultures où il y a l'utilisation d'une seule population bactérienne; tandis que d'autres chercheurs ont préféré effectuer des traitements avec des cultures mixtes (24-32). L'utilisation de monocultures ou encore de cultures mixtes implique qu'on connaît les populations bactériennes qui composent les cultures, par opposition à des consortiums où l'on ne connaît pas exactement le contenu en populations microbiennes (33). Par contre, on utilise souvent des consortiums puisqu'on se réfère à leur capacité à dégrader des groupes de composés toxiques; étant donné que les milieux desquels on se les procurent contiennent les composés à se débarrasser et sur lesquels les populations bactériennes se sont développées. Il existe également des cultures mixtes enrichies avec d'autres microorganismes non identifiés et isolés à partir de milieux contaminés (34).

Les microorganismes en milieu aérobie capables de dégrader le PCP ont été isolés et les meilleures souches décrites dans les publications sont celles de *Rhodococcus chlorophenolicus* (24), de *Flavobacterium* sp. (27,30) et la souche ATCC 33790 d'*Arthrobacter* sp. (8,26,35).

Plusieurs chercheurs ont constaté la décomposition du PCP par digestion anaérobie à l'aide de cultures libres, de boues granulaires ou de films biologiques de cultures fixes (10,11,36-39).

La littérature rapporte également l'utilisation de certains champignons du groupe de la moisissure blanche du bois. En plus de dégrader la lignine, ils sont capables d'attaquer les polluants aromatiques persistants dans l'environnement. Le mécanisme de dégradation de ces composés est dépendant des métabolismes de dégradation de la lignine de ces champignons. Le champignon de la moisissure blanche qui dégrade les principaux

composants du bois est *Phanerochaete chrysosporium* et a démontré sa capacité à biodégrader le PCP (40-41).

2.4 Biodégradation du pentachlorophénol

Tel que mentionné dans la section précédente, il est possible de dégrader biologiquement le PCP dans des réacteurs tant sous conditions anaérobiques qu'aérobiques. La cinétique de conversion enzymatique du PCP a également fait l'objet de plusieurs études (34,42).

Dans le processus de dégradation anaérobie du PCP, on assiste à la déhalogénéation du composé par un mécanisme réducteur où il y a remplacement de l'halogène par un proton. Le PCP est minéralisé en CH_4 et en CO_2 , après que l'anneau benzénique soit entièrement déhalogéné. La facilité à déhalogéner est relative à la position des halogènes sur l'anneau benzénique. Mikesell et Boyd (39) ont proposé une voie métabolique expliquant les réactions de dégradation anaérobie du PCP avec des boues d'effluents municipaux (figure 2.3).

Les mécanismes responsables du succès de la dégradation des polluants ne sont pas encore complètement compris. Les travaux de Autenrieth et al. (43) ont proposé des voies métaboliques de biodégradation du PCP avec des microorganismes en aérobiose. La première étape (figure 2.4), est un métabolisme lent de la biodégradation du PCP, suivi d'une ouverture du cycle. L'étape 2 est au contraire, un métabolisme rapide qui est également suivi d'une ouverture du cycle. L'étape 3 illustre la libération des ions chlorures avec une ouverture du cycle. Dans le cas du PCP qui est un haloaromatique avec un haut niveau de chloration, un halogène doit être remplacé par un groupement hydroxyle sur l'anneau, avant que ne puisse commencer la rupture de cet anneau. Tandis que dans le cas de la biodégradation des haloaromatiques

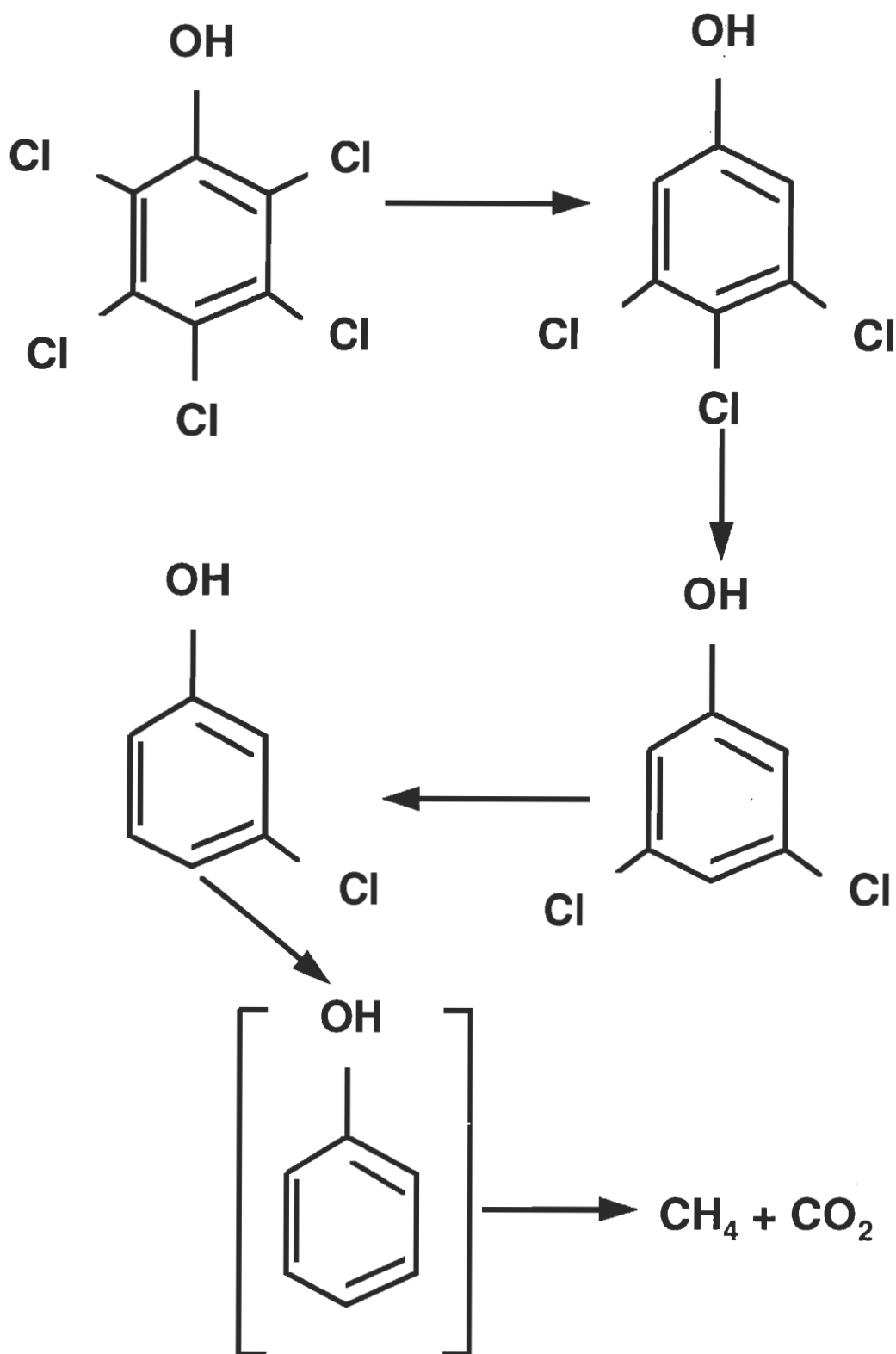


FIGURE 2.3 La voie métabolique proposée dans la dégradation anaérobie du PCP par des boues municipales acclimatées

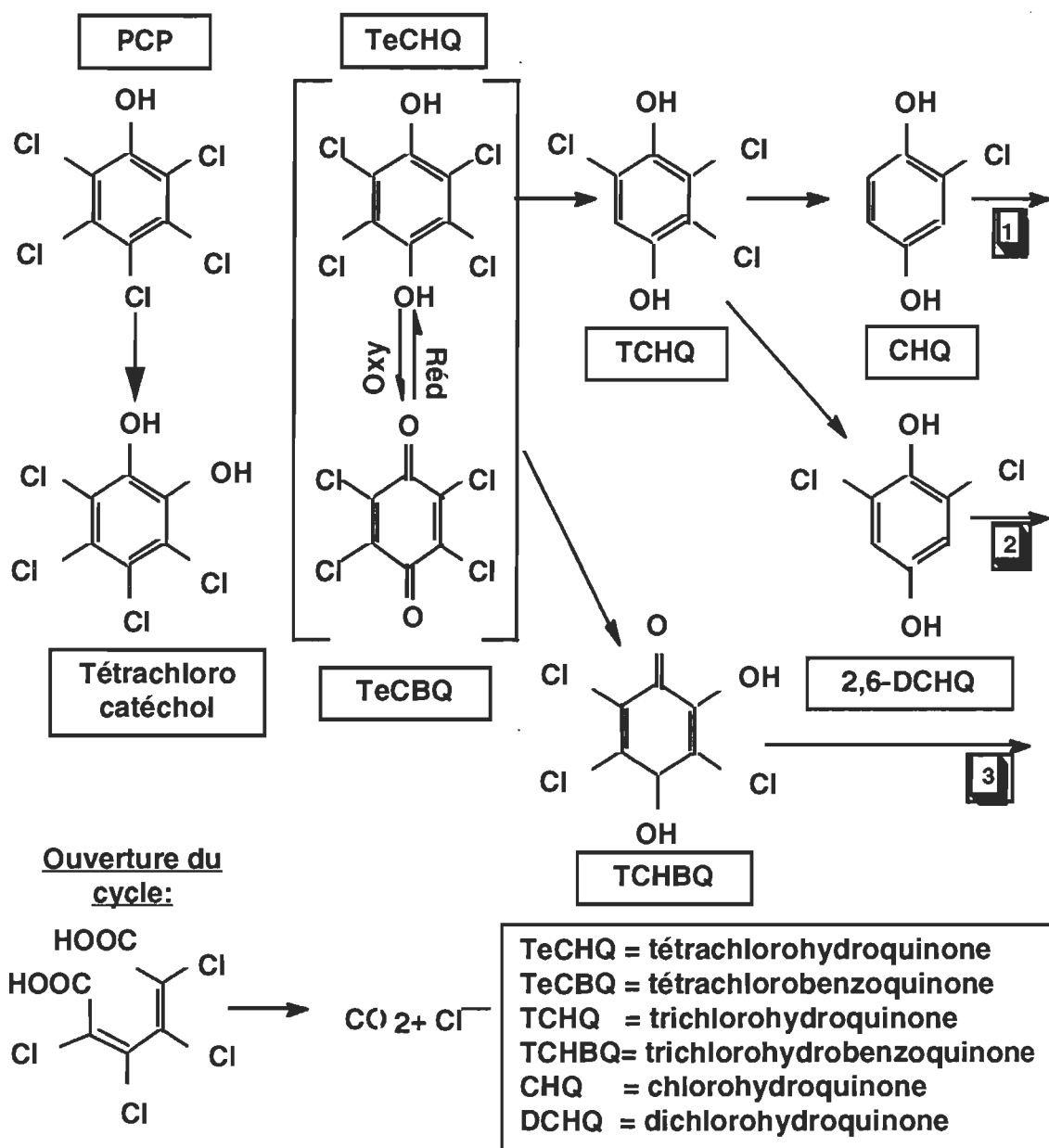


FIGURE 2.4 Les voies métaboliques potentielles de la dégradation aérobie du PCP

avec un faible niveau de chloration, les liens carbone-chlore demeurent jusqu'à ce que la structure de l'anneau s'ouvre par l'action de l'enzyme oxygénase; avec l'enlèvement subséquent d'un halogène donnant du chlorure d'hydrogène. Tel que présenté à la figure 2.4, après la consommation d'oxygène, la substitution d'un chlore par un groupement hydroxyle génère, entre autre, un composé de type catéchol appelé tétrachlorocatéchol. C'est une étape commune dans le métabolisme de biodégradation des composés phénoliques, elle se produit tant avec l'anneau benzénique qu'avec les biphényles. Les deux groupements fonctionnels hydroxyles en position ortho permettent la rupture enzymatique de l'anneau produisant ainsi des acides organiques (43). La conversion enzymatique du PCP forme également un composé de type quinone sous forme oxydée (tétrachlorobenzoquinone) ou sous forme réduite (tétrachlorohydroquinone) (figure 2.4) avec la possibilité de formation ultérieure de métabolites intermédiaires. Les étapes 1, 2 et 3 donnent lieu à une ouverture du cycle aromatique dont les produits de la réaction sont le CO_2 et les ions chlorures. Ces derniers formeront par la suite des sels de chlorures organiques et inorganiques.

En résumé, toutes les voies métaboliques de la biodégradation du PCP consiste en une déhalogénéation étape par étape; que ce soit une déchloration oxydante (aérobie) ou réductrice (anaérobie). L'enlèvement de plusieurs atomes de chlore, permet l'ouverture du cycle aromatique (8,10). Les populations bactériennes doivent donc posséder des enzymes capables de briser le lien carbone-chlore dans la molécule de PCP.

Les travaux de Schenk et al. (8) ont conduit à l'identification d'un sous-produit, la tétrachlorohydroquinone, ce qui prouve la déhalogénéation enzymatique du PCP avec la souche ATCC 33790 *Arthrobacter* sp. L'auteur a montré qu'un enzyme, appelé PCP déhalogénase, que possède cette souche, catalyse la réaction de déchloration oxydante (figure 2.5). Les résultats obtenus

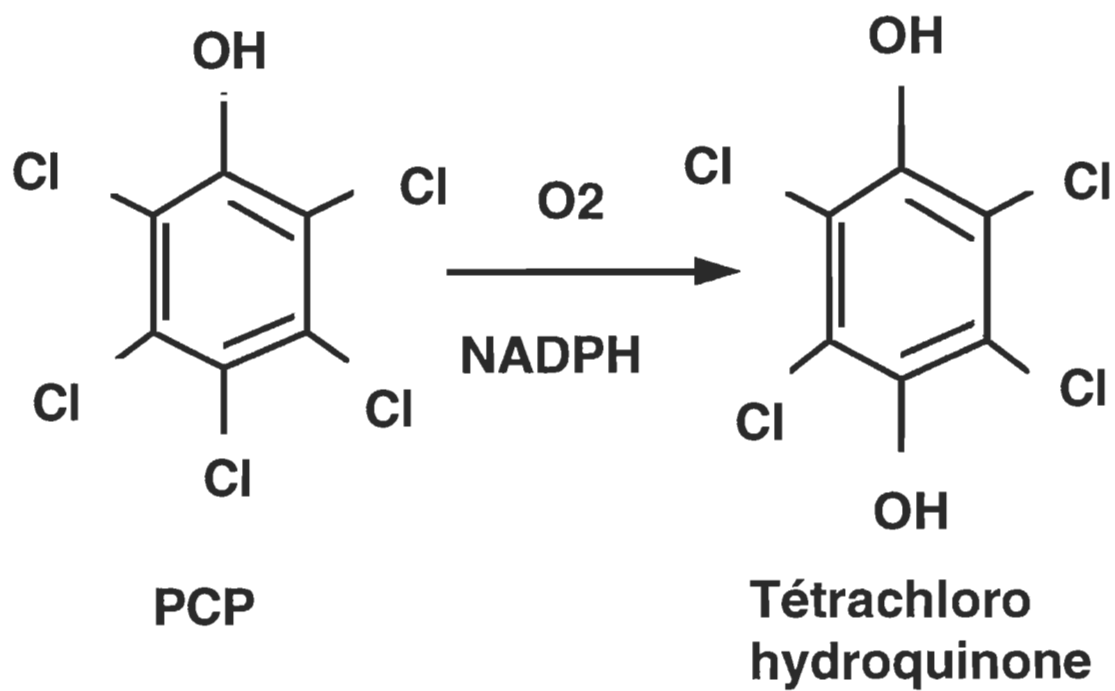


FIGURE 2.5 Réaction catalysée par l'enzyme PCP déhalogénase de la souche ATCC 33790 *Arthrobacter* sp.

montrent que l'enzyme responsable de la déhalogénéation initiale du PCP n'est pas un enzyme soluble. L'identification des produits intermédiaires de la conversion enzymatique du PCP confirme les observations de plusieurs auteurs (16,44,45,46) sur la formation de nombreux métabolites hydroxylés, solubles dans l'eau, durant la dégradation du PCP. L'enzyme PCP déhalogénase est spécifique, elle brise le lien carbone-chlore, l'oxygène est essentiel pour la conversion enzymatique du PCP.

Le lien carbone-chlore étant très stable, la rupture de ce lien n'est pas exothermique mais requiert un apport d'énergie substantiel, car la déhalogénéation est une réaction endothermique (6). Malgré le fait que la déhalogénéation des composés organiques est thermodynamiquement favorisée sous des conditions anaérobiques, selon Atlas et Bartha (6), la biodégradation aérobie est plus rapide (47).

L'attaque microbienne s'étend sur les isomères de structure du PCP car la spécificité du site de liaison (complexe substrat-enzyme) est moins élevée que la spécificité du site catalytique (lien carbone-chlore) (43). Les réactions catalysées par l'enzyme ont lieu dans une poche asymétrique de l'enzyme appelé le site actif de l'enzyme. La configuration et la composition chimique du site actif déterminent la spécificité de la catalyse enzymatique. Théoriquement, le site actif peut se subdiviser en site de liaison, lequel inclus des résidus d'acides aminés qui viennent en contact avec le substrat, et un site catalytique, (figure 2.6). La rupture du lien carbone-chlore se produit sur tous les substrats organochlorés analogues au PCP. Cependant la dégradation des chlorophénols moins halogénés est plus difficile que celle du PCP par des populations bactériennes dégradatrices de PCP (47,48).

2.5 Détermination quantitative du pentachlorophénol

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer quantitativement le PCP, le plus souvent on dose le PCP par des méthodes spectrophotométriques et chro-

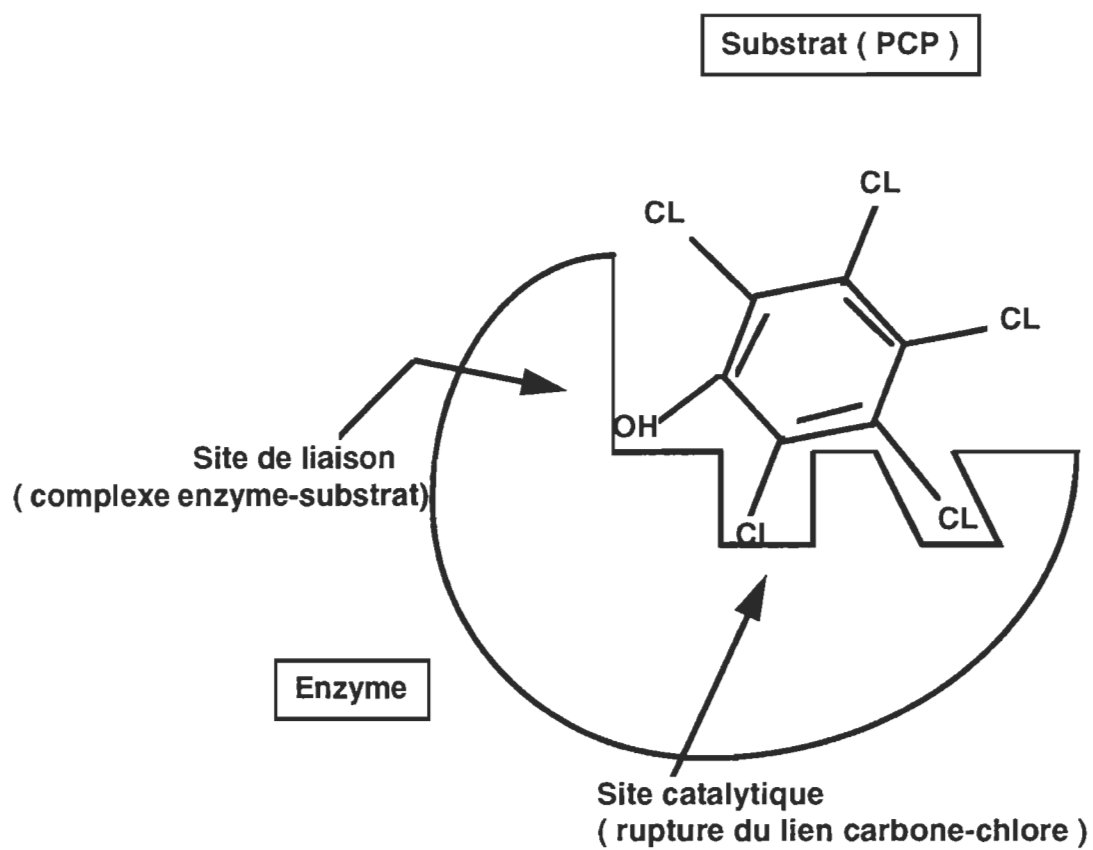


FIGURE 2.6 Site actif de l'enzyme

matographiques.

Le PCP est un acide faible, il est rapidement converti en sel de sodium ou de potassium par réaction avec une base appropriée. La solubilité du NaPCP dans l'eau à pH neutre est de 32 g/L, elle augmente à 200 g/L à pH 10.0 (49). Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet (UV) pour le PCP sous forme non ionisée montre un maximum à 303 nm; pour l'ion NaPCP à pH 10.0 le spectre UV montre des maximums à 248 nm et 323 nm. A pH 7.3, la longueur d'onde maximum est à 320 nm (16).

Le PCP ou son sel de sodium peut être estimé par colorimétrie du condensat d'oxydation. Un complexe bleu; le 4-aminophénazone-pentachlorophénol absorbe à une longueur d'onde de 585 nm (50). Le PCP dissout dans un solvant organique peut également être détecté par l'amplitude de la dérivée seconde du spectre dans l'UV entre 304 et 297 nm (51).

Le PCP peut être analysé par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) dont le chromatographe est muni d'un détecteur UV (52).

Le dosage du PCP peut s'effectuer par chromatographie en phase gazeuse (CG) étant donné que celui-ci est un composé partiellement volatil. Le chromatographe en phase gazeuse est muni d'un ou de plusieurs détecteurs. Les trois détecteurs fréquemment utilisés sont le détecteur à ionisation de flamme (DIF), le détecteur à capture d'électron (DCÉ) qui est un détecteur spécifique aux atomes électronégatifs et le CG couplé à spectromètre de masse (SM). Dans la présente étude la technique utilisée pour l'analyse quantitative du PCP est le CG/DCÉ.

2.5.1 Chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à capture d'électron

Lorsque les molécules sont volatiles, la méthode d'analyse utilisée est la chromatographie en phase gazeuse. L'échantillon solubilisé dans un liquide volatil est vaporisé à l'injection et parcourt la colonne chromatographique à l'aide d'un éluant gazeux inerte. Le gaz vecteur est généralement de l'hélium, de l'azote ou de l'hydrogène. Ce gaz doit servir de phase mobile dans le système et ne doit pas réagir avec la phase stationnaire. Sa pression et sa vitesse doivent donc être contrôlées. Après avoir traversé la colonne, les solutés séparés passent à travers le détecteur où le résultat est enregistré sur ordinateur.

En chromatographie gazeuse, la phase stationnaire, est la plupart du temps un liquide non volatil adsorbé sur un support solide, elle représente la surface de particules solides utilisées pour remplir une colonne de verre. Le partage des solutés entre les phases mobile et stationnaire contribue à la séparation. Le soluté qui a une plus grande affinité pour la phase stationnaire se déplace plus lentement à travers la colonne, il possède un temps de rétention (T_R) plus long qu'un autre soluté du mélange. La forme la plus commune de la CG est appelée la chromatographie de partition gaz liquide (CGL). Dans cette technique la phase stationnaire forme un mince film sur la surface d'un support solide. Le soluté s'équilibre entre le liquide de la phase stationnaire et le gaz de la phase mobile. Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé cette technique.

2.5.1.1 La chromatographie de partition gaz liquide capillaire

En CGL, on peut utiliser une colonne de verre, une colonne mégabore ou encore une colonne capillaire. La détermination du PCP a été effectuée par CGL capillaire.

La colonne capillaire est composée de trois parties: (a) la silice fondue (b) du polyimide et (c) une phase stationnaire (figure 2.7).

La silice utilisée pour fabriquer les colonnes capillaires est du quartz synthétique. La silice est fondue sur la face intérieure du tube.

La surface extérieure du tube est recouverte de polyimide. Ce recouvrement possède deux fonctions. Premièrement, il remédie à n'importe quelles imperfections du tube. Deuxièmement, il fournit une barrière résistante et à l'épreuve de l'eau. La combinaison des deux fonctions donnent donc plus de force et de durabilité au tube.

La phase stationnaire est un polymère qui enduit la paroi intérieure de la silice fondue et elle est liée à cette surface interne par des liens covalents. L'épaisseur, l'uniformité et la nature chimique de la phase stationnaire sont extrêmement importants. C'est la phase stationnaire qui a la plus grande influence sur les séparations obtenues. La plupart des phases stationnaires capillaires sont des polymères de silicone. Le type et la quantité de substitution sur le polysiloxane distinguent les phases stationnaires les unes des autres de par leurs propriétés. La description de la phase réfère à la quantité et au type de substitution sur la chaîne de polysiloxane. La phase stationnaire utilisée pour le PCP contient 5 % de phénylméthylpolysiloxane. La figure 2.8 montre la structure de la phase stationnaire qui a été choisie pour le projet.

2.5.1.2 La phase stationnaire

Dans des conditions d'opération constantes, c'est la structure de la phase stationnaire qui détermine la rétention relative (l'ordre d'élution) des composés. Si deux composés ont des T_r différents, ils seront alors séparés. Si au contraire les deux composés prennent le même temps pour migrer à travers la colonne, il y aura co-élution.

Recouvrement en polyimide

Intérieur de la colonne capillaire

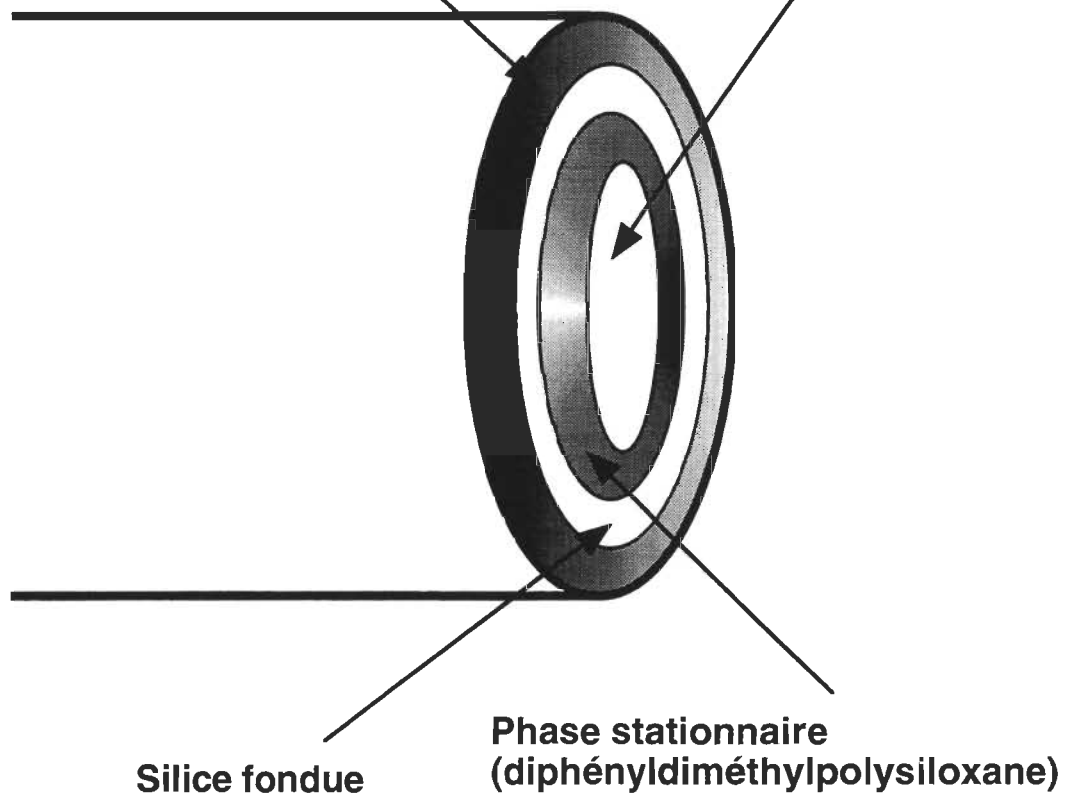


FIGURE 2.7 Les composantes d'une colonne capillaire

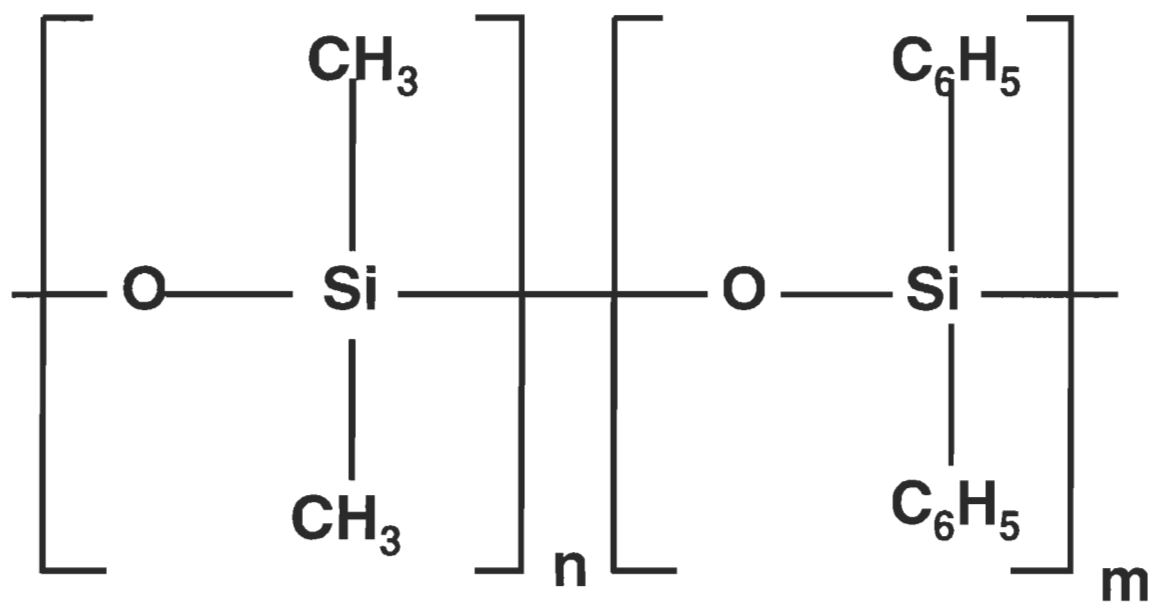


FIGURE 2.8 Structure du diphényldiméthylpolysiloxane

Les colonnes sont sélectionnées selon leur polarité qui est déterminée par la structure du polymère. La polarité a un effet sur certaines caractéristiques tel que le temps de vie de la colonne, les limites de température, le degré de détérioration de la phase stationnaire et la capacité d'échantillon. C'est la sélectivité de la phase stationnaire qui influence directement les séparations. L'épaisseur du film affecte la rétention et la capacité d'une colonne.

Comme pour la polarité, la sélectivité de la phase stationnaire est déterminée par sa structure. La sélectivité est définie comme étant l'habilité de la phase stationnaire à différencier deux composés en vertu d'une différence dans leurs propriétés chimiques et /ou physiques. Dans cette perspective, s'il y a une différence discernable dans les propriétés des deux composés, la quantité d'interactions entre les composés et la phase sera différente. Les facteurs relatifs à la phase stationnaire et au soluté telle la polarisabilité, la solubilité, l'amplitude du comportement des liaisons hydrogène et des liaisons dipôles-dipôles influenceront la sélectivité. Malheureusement, la plupart des caractéristiques, telle la force de la liaison hydrogène ou de la liaison dipôle-dipôle ne sont pas rapidement disponibles ou facilement déterminées. Ceci fait en sorte qu'il est difficile de prédire avec précision et d'expliquer les séparations obtenues pour une colonne et une série de composés donnés. Cependant toutes les phases stationnaires auront une polarisabilité reliée aux interactions (liaisons hydrogène et Van der Waals). Une rétention augmentée se produit pour des solutés qui sont plus polarisables.

L'épaisseur du film que représente la phase stationnaire, affecte le caractère de rétention et la capacité d'une colonne. L'augmentation de l'épaisseur du film provoquera une augmentation substantielle du T_r d'un soluté. Les colonnes dotées d'un film épais sont utilisées principalement pour la séparation de solutés extrêmement volatils. L'augmentation de l'épaisseur du film dans le but d'améliorer une séparation sera efficace seulement pour les

solutés faiblement retenus. Pour les échantillons qui ne nécessitent pas un film épais, le temps d'analyse avec ce film sera inutilement trop long.

Les colonnes dotées d'un mince film sont utiles pour l'analyse d'échantillons peu volatils ou à hauts points d'ébullition.

On peut se référer à de nombreux ouvrages traitant de l'analyse instrumentale pour connaître davantage les notions essentielles de la chromatographie à haute performance.

2.5.1.3 Système chromatographique

Dans un système chromatographique en phase gazeuse, le débit du gaz vecteur est dépendant de la température de la colonne.

Pour les colonnes capillaires, le débit du gaz vecteur est préférablement exprimé en vitesse linéaire moyenne (μ , cm/sec) au lieu d'un débit volumique.

La plupart des détecteurs disponibles sur le marché requièrent un débit de gaz total de 30-40 mL/min pour la meilleure sensibilité et la forme des pics du chromatogramme. Le débit du gaz vecteur pour une colonne capillaire se situe de 1-5 mL/min. Ces débits sont bien en dessous de l'étendue dans laquelle opèrent les détecteurs. Pour y pallier, un gaz complémentaire est ajouté à la sortie de la colonne pour obtenir un débit de gaz total de 30-40 mL/min qui arrive au détecteur. Le gaz complémentaire peut être le même que le gaz vecteur ou différent de celui-ci, selon du type de détecteur utilisé.

2.5.1.4 Injecteur "split-splitless"

En CGL, l'injection d'un échantillon doit suivre deux conditions: la première est l'introduction de l'échantillon dans la colonne de telle sorte qu'il occupera la longueur de colonne la plus petite, la seconde est de conserver la

composition de l'échantillon une fois introduit dans la colonne le plus près possible de sa composition avant l'injection.

Il y a quatre principales techniques d'injection capillaire en CG (a) "split" (b) "splitless" (c) "on-column" (d) "Megabore direct". Les injecteurs capillaires standards sont capables d'injections en mode "split" et en mode "splitless". Les injections "on-column" nécessitent un injecteur capillaire "on-column". Les injections "Megabore" requièrent des injecteurs pour colonnes de verre à garnissage.

Les techniques d'injection qui ont été utilisées par CGL capillaire de partition, sont l'injection en mode "split" pour le dosage du PCP et l'injection en mode "splitless" pour la dosage des acides gras et résiniques.

L'injection en mode "split" est simple et la plus commune des techniques d'injection capillaire. On l'utilise pour des échantillons très concentrés avec des concentrations types de l'ordre de 0.1-10 µg/mL et on injecte des volumes de 1 à 2 µl habituellement.

A l'exception de l'injection "on-column", tous les types d'injecteurs sont basés sur le principe de vaporisation de l'échantillon pour l'introduire dans la colonne. La température de l'injecteur doit être suffisamment élevée pour assurer l'évaporation instantanée de la totalité de l'échantillon sans toutefois dégrader les composés de l'échantillon. Pour la plupart des échantillons, 250 °C est une température adéquate. Avec l'injection en mode "split", l'échantillon est vaporisé au cours de l'injection et rapidement mélangé avec le gaz vecteur. C'est seulement une petite quantité de gaz vecteur qui entre dans la colonne et une portion beaucoup plus grande quitte l'injecteur via l'évent de séparation (split vent). Puisque l'échantillon est mélangé avec le gaz éluant, seulement une petite quantité de l'échantillon injecté entre dans la colonne. Le débit total de

gaz à travers l'injecteur au moment de l'injection est relativement haut, il représente la somme des débits de la colonne et du "split vent". L'échantillon est rapidement transporté dans la colonne.

La quantité d'échantillon qui entre dans la colonne est dépendante des débits du gaz vecteur dans la colonne et vers l'évent. En mesurant le débit de la colonne et celui à l'évent, la quantité d'échantillon qui subit une séparation peut être calculée. Cette valeur est appelée le rapport de séparation (split ratio) et il est déterminé selon l'équation suivante:

$$\text{"Split ratio"} = \frac{\text{débit de la colonne} + \text{débit à l'évent}}{\text{débit de la colonne}} \quad [2.1]$$

L'étendue de "split ratios" utilisés est de 1:10 à 1:100. Le "split ratio" choisi pour le dosage du PCP est 1:10, c'est donc le 1/10 de l'échantillon de PCP qui est acheminé vers la colonne capillaire et les 9/10 de l'échantillon sont purgés vers l'évent du chromatographe. En plus des applications pour les échantillons très concentrés l'injecteur en mode "split" est adéquat pour des colonnes de très petits diamètres.

Les injections en mode "splitless" sont utilisées pour les analyses à l'état de trace. Elles sont un peu plus complexes que les injections en mode "split" et sont sujettes à plusieurs restrictions et conditions.

L'échantillon injecté est évaporé et transporté dans la colonne par le gaz éluant. Au moment de l'injection, le débit à travers l'injecteur est le même que celui de la colonne (1-2 mL/min). Une période de 15 à 90 secondes après le moment de l'injection, le débit additionnel du gaz transporteur est introduit dans l'injecteur. Ce gaz purge l'injecteur de n'importe quel échantillon restant qui n'a pas entré dans la colonne. Le temps auquel le débit de gaz en extra est introduit est appelé le temps d'activation de purge.

Avec les injections en mode "splitless", l'échantillon est introduit dans la colonne à un taux beaucoup plus lent qu'avec les injections en mode "split". Une nécessité des injections en mode "splitless" est que la température initiale de la colonne soit au moins 10°C en dessous du point d'ébullition du solvant de l'échantillon. Quand le solvant évaporé quitte l'injecteur, et entre dans la colonne plus froide, le solvant se condense rapidement à la tête de la colonne. Un film de solvant se forme et trappe l'échantillon. Ceci est appelé l'effet de solvant.

Les volumes d'injection dans ce mode sont habituellement limités à $2\mu\text{l}$ ou moins. Une autre limite des injections de mode "splitless" est que les composés qui éluent avant le front de solvant sont difficilement déterminés avec précision. La discrimination de masse à l'entrée, est moins sévère que pour les injections de type "split". Le phénomène de discrimination de masse sera traité dans une des sections subséquentes.

La plupart des injecteurs capillaires en mode "split / splitless" sont dotés d'une purge destinée au septum. Le gaz de nettoyage balaie la face interne du septum et transporte les contaminants vers l'évent du septum. Le débit de gaz pour l'épuration au septum est entre 0.5 et 5 mL/min.

2.5.1.5 Détecteur à capture d'électron

Le détecteur à capture d'électron (DCÉ) a été utilisé comme détecteur lors du dosage du PCP par chromatographie capillaire de partition gaz-liquide.

Le détecteur à capture d'électron mesure une perte de signal quand l'échantillon est élué et arrive au détecteur. Quand le gaz vecteur est l'hélium ou de l'hydrogène, on utilise de l'azote comme gaz complémentaire avant le détecteur. L'azote entrant dans le détecteur est ionisé par des électrons de haute énergie (rayons β) émis à partir d'une feuille sur laquelle est adsorbé

comme source radioactive, l'isotope ⁶³Ni. Les électrons ainsi formés sont attirés vers une anode, produisant un petit courant constant. Quand les molécules de l'échantillon, ayant une haute affinité pour les électrons, entrent dans le détecteur, elles capturent quelques électrons et réduisent le courant à l'anode. Ce détecteur est particulièrement sensible aux molécules contenant des halogènes, des carbonyles conjugués, des nitriles, des composés nitro et des composés organométalliques. Le PCP étant un composé organique halogéné, nous avons choisi comme détecteur le DCE. Les gaz vecteur et complémentaire doivent être extrêmement secs car l'eau diminue la sensibilité.

2.6 Détermination quantitative de la matière organique et inorganique des milieux aqueux et leur toxicité

Dans son règlement sur les effluents de pâtes et papiers, adopté en mai 1992 en vertu de la loi sur les pêches, le gouvernement fédéral désigne trois substances nocives présentes dans les effluents de fabriques de pâtes et papiers: (a) les matières en suspension (MES); (b) les matières exerçant une DBO; (c) les effluents à létalité aiguë. Les principaux paramètres mesurés dans les rejets de fabriques de pâtes et papiers sont les matières en suspension (MES), la demande biologique en oxygène (DBO₅) et la toxicité.

Dans l'industrie papetière, suite à la mise en pâte et à l'obtention de produits finis, les rejets liquides contiennent entre autre une forte proportion de MES. Au cours de nos travaux, ce paramètre n'a pas été mesuré, car le projet de recherche s'est limité à l'utilisation de bioréacteurs. Les filtrats aqueux correspondant à chaque échantillon de pâte prélevé au cours de l'expérimentation, ont été caractérisés pour leur contenu en matière organique et inorganique et pour leur toxicité.

2.6.1 La demande biochimique en oxygène (DBO_5)

L'oxydation des composés organiques biodégradables par les microorganismes entraîne une consommation d'oxygène: le milieu exerce donc une certaine demande biochimique d'oxygène. La mesure de cette DBO permet d'évaluer le contenu d'une eau en matières organiques biodégradables et donc, dans une certaine mesure, sa qualité ou son degré de pollution.

La dégradation complète des matières organiques peut prendre plusieurs semaines. D'autre part, l'oxydation des dérivés ammoniacaux et des nitrites en nitrates (nitrification) absorbe également de l'oxygène. Cette nitrification ne débute qu'au bout d'une dizaine de jours.

Pour ces deux raisons, on mesure la demande biochimique d'oxygène après 5 jours (DBO_5). La culture bactérienne décompose tant la matière organique dissoute que la matière organique en suspension.

Quand l'eau contient également des réducteurs énergétiques, comme les sels ferreux, les sulfites ou les sulfures, leur oxydation se fait rapidement par voie chimique, en moins de 15 minutes. Cette oxydation correspond à une demande immédiate d'oxygène (DIO) que l'on peut ou non inclure dans la DBO.

La DBO_5 est une méthode universellement connue, peu précise pour qualifier des eaux mais utile pour surveiller l'efficacité d'un procédé.

La teneur en oxygène dissous (OD) dans une eau saturée est égale à 9.17 mg/L. Après incubation pendant 5 jours à 20 °C en l'absence d'air et de la lumière pour éviter toute photosynthèse, on détermine la quantité d'oxygène

consommé (DBO_5) que l'on exprime en unités de concentration (mg d'oxygène par litre d'échantillon). La DBO_5 est égale à la différence entre la quantité d'OD initial et la quantité d'OD résiduel à la fin de la période d'incubation. En général on dose l'OD par iodométrie ou grâce à un oxygénomètre. Une mesure de DBO_5 est considérée comme valable si la teneur en OD résiduel est supérieure à 1 ppm et si la chute de l'OD est supérieure à 2 ppm. Les meilleures déterminations sont celles où environ 35 à 60 % de l'OD initialement disponible est consommé. Si l'échantillon contient un fort niveau de pollution, il est préférable de le diluer en utilisant trois pourcentage de dilution (P) pour une mesure plus fiable. Il faut diluer l'échantillon à l'aide d'une eau n'exerçant aucune demande d'oxygène et saturée en oxygène. L'eau de dilution doit être préalablement aérée par barbotage et doit contenir une concentration d'OD entre 8 et 9.17 ppm.

L'incubation de l'échantillon de filtrat aqueux avec l'inoculum correspond à une période de respiration bactérienne, à laquelle le milieu doit être favorable. Le pH de l'échantillon de filtrat aqueux doit être voisin de 7, pour cette raison, l'eau de dilution est tamponnée à pH 7.0, et contient les nutriments nécessaires à l'inoculum du test. Elle contient les sels minéraux essentiels tels phosphate et les sels de Ca, Mg et de Fer.

L'échantillon ne doit pas contenir de substances inhibitrices pour les populations bactériennes du test. Le chlore doit être détruit et la présence de substances toxiques, comme les cyanures et les métaux lourds rendent les résultats difficilement exploitables, en dépit de l'utilisation de cultures spéciales.

Les inoculums employés pour déterminer la DBO_5 sont variés. Il y a les semences acclimatées, les cours d'eau où la collecte de l'eau est prise en aval,

les liqueurs des systèmes de traitement des eaux des stations municipales et les "polyseeds" qui sont des cultures bactériennes sous forme de pastilles que l'on doit reconstituer avec l'eau de dilution. La détermination de la DBO_5 avec les échantillons de filtrats aqueux de notre projet a été effectué avec une semence acclimatée.

Le calcul de la DBO_5 se fait selon les équations suivantes:

1. Si il n'y a pas de dilution de requise

$$DBO_5 \text{ (ppm)} = D_1 - D_2 \quad [2.2]$$

2. Si il y a une dilution de requise

$$DBO_5 = \frac{D_1 - D_2}{P} \quad [2.3]$$

3. Si l'eau de dilution estensemencée et qu'il y a dilution de l'échantillon

$$DBO_5 = \frac{(D_1 - D_2) - (B_1 - B_2) * F}{P} \quad [2.4]$$

où D_1 = L'OD initial de l'échantillon

D_2 = L'OD final après la période d'incubation de cinq jours

P = pourcentage de dilution

B_1 = L'OD dans le contrôle avant incubation. Eau de dilution et la semence

B_2 = L'OD dans le contrôle après incubation

F = Rapport de la semence dans l'échantillon et la semence dans le contrôle

Les mesures de DBO_5 , nous renseignent seulement sur le contenu des eaux, lequel est biodégradable en cinq jours. D'autres paramètres sont utilisés pour mesurer la charge organique difficilement et non biodégradable des eaux.

2.6.2 La demande chimique en oxygène (DCO)

La DCO est une mesure de toutes les matières organiques contenues dans les échantillons de filtrat aqueux qu'elles soient ou non biodégradables.

L'oxydation dans des conditions énergétiques, par voie chimique, se fait sous l'action d'un oxydant puissant en excès, le bichromate de potassium, en milieu acide fort (H_2SO_4) et à reflux pendant deux heures. Les hydrocarbures aliphatiques stables nécessitent l'emploi d'un catalyseur comme le sulfate d'argent. Les hydrocarbures aromatiques, la pyridine et l'acide acétique résistent à cette oxydation bien que ce dernier soit biodégradable. L'ammoniac n'est pas oxydé, mais les nitrites le sont.

L'oxydation chimique des échantillons de filtrats aqueux a été effectuée par une méthode de digestion dans un réacteur. La mesure de la DCO a été effectuée par une méthode colorimétrique. La valeur de la DCO est exprimée en mg d'oxygène consommé par litre d'échantillon. Les composés organiques oxydables réagissent en réduisant les ions dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) en ions chromique (Cr^{3+}). La quantité de Cr^{3+} produit, est déterminée. Le rapport de DCO et de DBO_5 est souvent de l'ordre de 1.5 à 2.

2.6.3 La mesure des carbones organiques totaux (COT)

Puisque certains composés organiques résistent à l'oxydation chimique et n'interviennent pas dans la DCO, une méthode plus énergétique pour les

oxyder complètement est nécessaire. On utilise un appareil à carbone total (CT) où les échantillons subissent une combustion totale à 950 °C sous l'action de l'oxygène gazeux.

La demande totale d'oxygène (DTO) est difficile à mesurer pratiquement, on préfère déterminer la quantité de gaz carbonique après une combustion totale et en déduire la quantité totale de carbone que contenait l'échantillon. A travers cette oxydation catalytique, l'échantillon est entièrement oxydé en CO_2 et en H_2O . Le débit de gaz entraîne le CO_2 à l'extérieur du tube à combustion, à travers un condenseur puis dans un séparateur gaz/liquide (chambre à carbone inorganique (CI) pour trapper la plus grande quantité d'eau possible. L'enlèvement de l'eau restante se fait par un déshumidificateur opérant entre 0-10 °C. Le CO_2 séché passe alors à travers un tamis retenant les halogènes. Le CO_2 se mesure par photométrie infra-rouge (un détecteur infrarouge non-dispersif (DIRN)), puisque le CO_2 absorbe fortement dans cette région.

Les échantillons de carbone inorganique (CO_3^{2-} , HCO_3^- et CO_2) sont introduits dans le réacteur qui contient de l'acide à la température de la pièce. Dans cet environnement acide, toutes formes de CI sont purgées à l'extérieur de la solution sous forme de CO_2 par un débit de gaz en continu. Le gaz continue à travers le déshumidificateur où il est séché et alors passe à travers le DIRN pour fins de quantification. Le système possède également la capacité de mesurer le carbone organique purgeable (COP) en purgeant l'échantillon avec 200 mL/min d'oxygène à la température de la pièce. Le gaz contenant le COP passe à travers un tube rempli d'hydroxyde de lithium pour enlever le CO_2

L'analyseur de CT mesure le carbone organique non purgeable (CONP) qui représente la fraction d'un échantillon aqueux qui demeure après acidification.

Dans ces conditions on mesure le CT, c'est à dire la somme du COT et du carbone minéral total des bicarbonates et des carbonates. Le COT s'exprime comme une concentration en mg de carbone par litre d'échantillon. Et en fait la mesure du COT conduit à une valeur inférieure à la DTO correspondante, puisqu'on ne considère pas l'oxydation d'autres éléments constitutifs comme l'hydrogène ou l'azote. On peut déterminer des relations empiriques entre le COT, la DCO et même la DBO_5 d'une eau à analyser.

2.6.4 La toxicité

La notion de toxicité est complexe, elle englobe de très nombreux éléments, sous des formes très variées (complexées, ionisées, oxydées). Elle est évaluée par un test biologique.

Il y a les essais biologiques avec la truite arc-en-ciel et avec la *Daphnia magna*. Ces essais sont exigés par le règlement sur les effluents de fabriques de pâtes et papiers. On mesure la CL_{50} en 96 heures dans le premier cas et en 48 heures dans le second cas.

La toxicité des échantillons de filtrats aqueux dans le projet de recherche a été évaluée par bio-essais de toxicité Microtox.

La détermination Microtox consiste à exposer des microorganismes à des échantillons et à mesurer l'effet toxique sur les microorganismes. Le réactif du test Microtox étant constitué de bactéries bioluminescentes, le système mesure la lumière émise par les bactéries après avoir été mises en contact avec un échantillon de toxicité inconnue et le compare avec la lumière émise

par un contrôle. Le degré de perte de lumière indique le degré de toxicité de l'échantillon. Certains échantillons d'eau affectent les microorganismes instantanément et d'autres complètent leur effet en cinq minutes. D'autres, notamment les métaux bivalents requièrent environ quinze minutes pour compléter leur effet.

Le test Microtox comporte l'établissement d'une courbe dose-réponse, sur laquelle on trouve la concentration effective (EC_{50}) qui cause un pourcentage de perte de lumière. La EC_{50} (t, T) est la concentration d'échantillon nécessaire pour provoquer une chute de 50 % d'émission de lumière, qui se traduit par une inhibition métabolique sur les microorganismes du test, sous des conditions définies d'un temps d'exposition (t) et à la température du test (T). Elle est exprimée en pourcentage. Les temps d'incubation appliqués dans la procédure sont de 5, 15 et 30 minutes (I_5 , I_{15} , I_{30}), habituellement, on considère la valeur de la EC_{50} pour un I_{15} .

2.7 Principe de fabrication d'une pâte thermomécanique

La fabrication des pâtes consiste à diviser le bois en fibres primaires tout en dégradant le moins possible ses propriétés. Cette division peut être obtenue par des moyens mécaniques ou une action de réactifs chimiques.

Les principales pâtes fabriquées industriellement peuvent être classées suivant leur rendement.

1. Rendement supérieur à 90 %: pâtes mécaniques, thermomécanique et chimicothermomécaniques
2. Rendement compris entre 80 et 90 %: pâtes chimicomécaniques
3. Rendement compris entre 70 et 80 %: pâtes mi-chimiques
4. Rendement compris entre 45 et 55 %: pâtes chimiques

Pour obtenir une pâte, il faut donc dépenser de l'énergie sous forme mécanique, chimique et calorifique. Si on n'utilise pas de réactifs chimiques, on consomme des kWh comme dans le cas des pâtes mécaniques et thermomécaniques (PTM). Un traitement chimique supprime presque totalement l'énergie mécanique (pâtes chimiques). Un traitement chimique ménagé exige, en contre-partie, une énergie mécanique pour défibrer totalement le bois (pâtes chimicomécaniques et mi-chimiques).

Dans le cadre de notre projet, nous avons fabriqué une pâte thermomécanique (PTM) à partir des copeaux de bois traités au PCP.

Le principe de fabrication d'une PTM (figure 2.9) se résume à trois principales interventions qui sont l'étuvage, le défibrage et le raffinage. D'abord les copeaux, une fois lavés sont soumis à un traitement à la vapeur qui s'effectue à une température supérieure à 100 °C et sous pression (2 à 3 bars). C'est ce qu'on appelle l'étuvage des copeaux.

Les installations de production de pâtes mécaniques de copeaux utilisent plusieurs stades, en général deux.

Après l'étuvage le premier stade de défibrage est effectué à une température comprise entre 110 et 130 °C et à une pression de 2 à 3 bars: soit les mêmes conditions que l'étuvage. A cette température, le bois se plastifie de telle sorte que la séparation des fibres est plus facile, les fibres sont alors moins endommagées. Les ruptures se produisent au niveau de la paroi secondaire des fibres, ce qui rend celles-ci accessibles à la fibrillation.

Dans le deuxième stade on effectue le raffinage à la pression atmosphérique, on accroît aussi la formation de microfibrilles. Pour les pâtes, il en résulte une plus faible teneur de la fraction bûchettes, une diminution des fi-

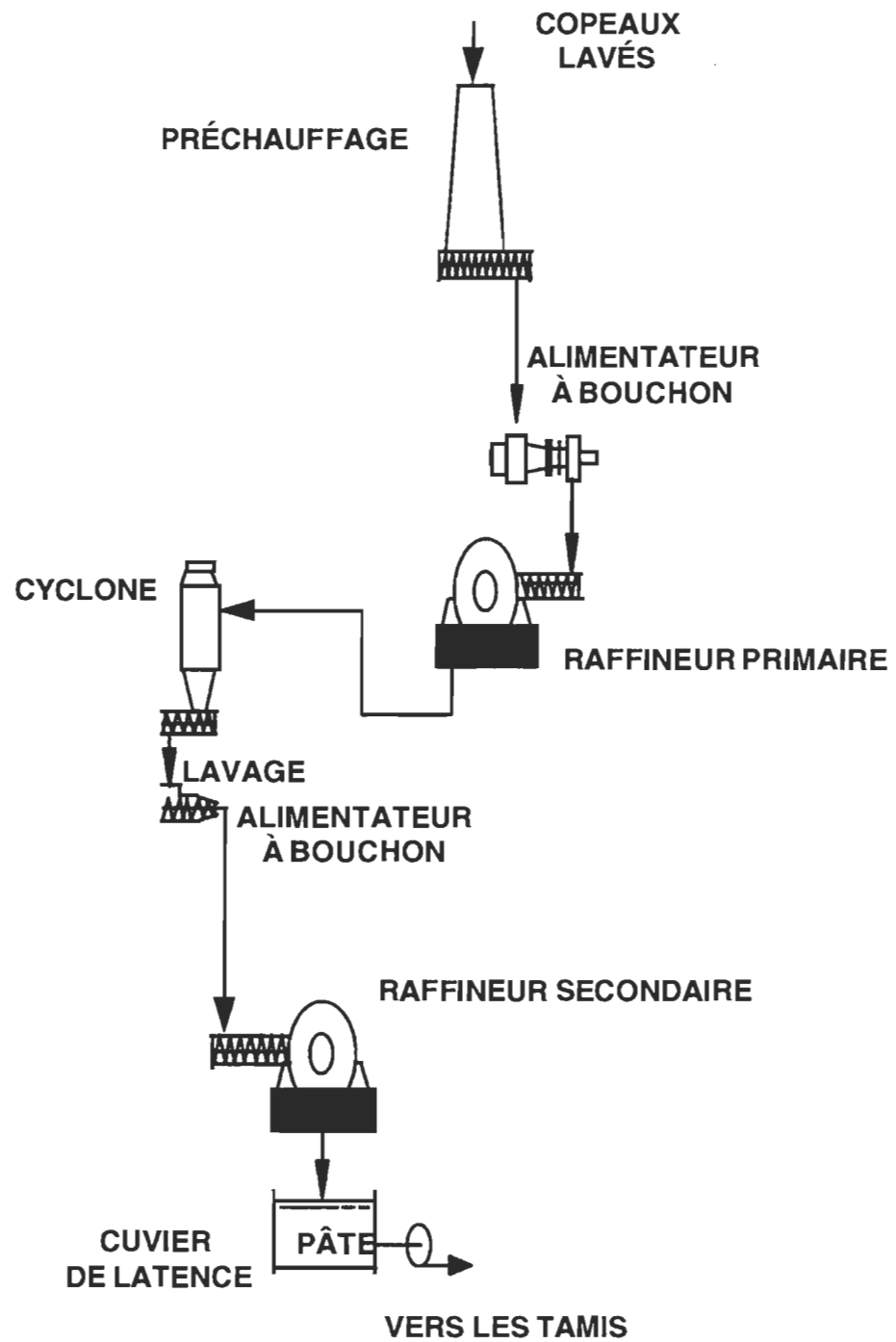


FIGURE 2.9 Principe de fabrication de la pâte thermomécanique (PTM)

bres longues et la résistance physique des fibres est plus élevée sauf leur résistance à la déchirure.

2.7.1 Le blanchiment des pâtes mécaniques

Une pâte mécanique contient, pour l'essentiel, tous les constituants du bois tels la lignine, les hémicelluloses, la cellulose et divers extractibles. Ces constituants n'ont été que très légèrement modifiés au cours du défilage mécanique.

Un certain nombre de groupements fonctionnels sont responsables de la coloration de la lignine et des extraits, tels que les doubles liaisons, les noyaux phénoliques et les quinones. Les très nombreuses possibilités de conjugaison qui peuvent exister entre chacun de ces groupements font de la lignine, un système fortement aromatique, siège de la coloration puisqu'il donne lieu à l'absorption de la lumière visible.

Le blanchiment des pâtes mécaniques consiste à attaquer la lignine sans la solubiliser par des réactions d'oxydation ou de réduction localisées sur les groupements fonctionnels indiqués précédemment. Le procédé de blanchiment avec préservation de la lignine, permet d'obtenir une amélioration modérée de la blancheur.

Dans le cadre de notre projet, nous avons évalué l'efficacité de notre système microbien sur le blanchiment de la pâte. L'utilisation des microorganismes peut permettre de réduire la quantité de produits chimiques utilisés dans le blanchiment et par conséquent la réduction des rejets.

2.8 Détermination quantitative des acides gras et résiniques (AGR) par chromatographie capillaire de partition gaz liquide avec spectromètre de masse

Parmi les matières extractibles que l'on retrouve dans le bois, il y a les ré-

sines et les graisses. Celles-ci sont une combinaison d'acides résiniques et gras respectivement. Les acides résiniques sont plus abondants chez les résineux comme par exemple le pin qui est l'essence utilisée pour les poteaux de lignes téléphoniques.

En chromatographie de partition gaz liquide, les acides gras et résiniques interagissent fortement avec la phase stationnaire. Ainsi pour éviter l'étalement des pics des analytes sur le chromatogramme, il est nécessaire de dériver les acides gras et résiniques.

La dérivation est un procédé qui consiste à modifier légèrement les composés à analyser. Les acides gras et résiniques extraits de la pâte de bois ont été dérivés par une réaction d'estérification.

La dérivation, ou l'estérification dans la cas présent, se résume à obtenir un ester de triméthylsilyle par dérivation avec du N-O-bis-triméthylsilyl trifluoroacétamide (BSTFA).

Dans une seconde étape, les esters triméthylsilyles d'acides gras et résiniques sont analysés par chromatographie capillaire de partage gaz liquide couplée à un spectromètre de masse.

La source dans un spectromètre de masse, sert à convertir les composés de l'échantillon en particules chargées. Dans ce processus; a lieu une fragmentation étendue des molécules de l'analyte, produisant un spectre des particules chargées ayant différents rapports masse / charge (m/z).

L'échantillon sous forme de gaz, est soumis au bombardement d'un canon à électrons de grande énergie (70 eV). Un électron est arraché aux molécules et on obtient une espèce qui est à la fois un cation (ion positif) et un radical libre (nombre impair d'électrons) que l'on appelle ion moléculaire ou ion

parent. A cause de l'énergie du faisceau ionisant, l'ion moléculaire se fragmente pour donner des ions positifs de masse plus faible, qui pourront se fragmenter à nouveau. Les ions sont attirés à travers une fente dans l'analyseur de masse, ils sont accélérés dans un champ électrique et sont dirigés entre les pôles d'un aimant quadrupolaire selon une trajectoire circulaire qui dépend de leur rapport masse / charge.

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

3.1 Préparation de l'échantillon

Les poteaux de lignes téléphoniques imprégnés de PCP que nous avons récupérés et utilisés pour notre projet de recherche provenaient de la compagnie Bell Canada et étaient âgés d'environ 60 ans. Leur imprégnation sous pression au PCP avait été réalisée à la compagnie Domtar. L'essence de ces poteaux de bois traités au PCP était du pin gris.

La mise en copeaux des poteaux de bois traité au PCP a été effectuée à la station forestière du Ministère des Ressources Naturelles du Québec à Duchesnay.

3.1.1 Mise en pâte du bois traité au PCP

Les copeaux de bois traité au PCP ont été tamisés par un classificateur "Rader". Par la suite, la PTM de pin gris a été produite selon les conditions opératoires décrites dans le tableau 3.1 à l'unité pilote Sunds du Centre de recherche en pâtes et papiers.

3.2 Biotraitement de la pâte thermomécanique de pin gris imprégnée de PCP

La pâte imprégnée de PCP, a été séchée à la température de la pièce jusqu'à l'obtention d'une siccité de 94 %, évaluée selon la méthode normalisée A.2 de l'ACPP.

Pour appliquer le traitement biologique sur la pâte contaminée au PCP, nous avons utilisé un réacteur biologique témoin et trois bioréacteurs contenant des masses croissantes de pâte imprégnée dont les conditions expérimentales sont détaillées dans le tableau 3.2 .

TABLEAU 3.1 Conditions d'opération de raffinage

		<i>pâte no.1</i>	<i>pâte no.2</i>
calcul de puissance			
électrique	charge totale (kw)	45	75
plaques (dilution)	plats (U.S. gal/min)	0.55	0.55
	coniques(U.S. gal/min)	0.25	0.25
plaques (distances)	plats (mm) (mesurée)	0.7	0.5
	coniques (mm) (mesurée)	2.1	1.5
raffineur	pression (psig)	24	25
lessiveur	pression (psig)	22	22
	rétenion (min)	6	6
	vis de déchargement (%)	40	40
	vis d'alimentation (%)	50	50
	pression de retenue (psig)	75	75
calcul de production	poids échantillon humide (g)	3420.8	1933.5
	temps échantillonnage (sec)	60	60
	échantillon-désint / (g)	250	200
	consistance chaudière (%)	0.58	0.685
	consistance (%)	16.24	23.98
	production sèche (kg/min)	0.556	0.464
calcul de l'énergie spécifique	total (kwh/TMSA)	929	2191
	indice d'égouttage (mL)	665	170

TABLEAU 3.2 Conditions d'opération du biotraitement appliqué sur la PTM de pin gris imprégnée de PCP

	bioréacteur témoin	bioréacteur no1	bioréacteur no 2	bioréacteur no 3
masse de PTM contaminée à siccité de 94 %	100	100	200	400
volume d'H₂O (L) deminéralisée ajouté à la PTM séchée	1.5	1.5	3.0	6.0
consistance de la PTM contaminée (%)	6	6	6	6
conditions d'aération régulateur de pression (lbs/po²)	2.5	2.5	2.5	2.5
débit d'air (mL/min)	150	150	150	150
concentration d'OD (ppm)	1 - 6	1 - 6	1 - 6	1 - 6
conditions d'inoculation le volume (mL) de l'inoculum no1 avec son milieu nutritif à 0 h	sans inoculum	100	300	600
les volumes (mL) de l'inoculum no 2 et de son milieu nutritif après un délai de 8 heures	sans inoculum	200	200	400
les volumes (mL) de l'inoculum no 2 et du milieu nutritif lors des réinoculations aux 5 jrs	sans inoculum	50	10	10

Pour obtenir une activité maximale, l'expérimentation s'est déroulée à la température ambiante, les semences étaient constituées de bactéries mésophiles (maximum d'activité des microorganismes dans une étendue de température de 20 à 45 °C) dans une gamme de pH compris entre 6.5 et 8.5. Les conditions d'aération sont nécessaires pour le procédé puisque les microorganismes sont aérobiques facultatifs c'est à dire que les populations bactériennes sont actives en présence ou en l'absence d'oxygène. Les bioréacteurs étaient reliés à un régulateur de pression d'air; en présence d'une trappe pour capter l'eau et l'huile et d'un rotamètre pour contrôler le débit d'air. Le débit d'air a été mesuré par une méthode volumétrique, soit par un déplacement de l'eau par l'air.

L'expérimentation a été effectuée avec des réacteurs biologiques aérobies en mode discontinu. Pour mener à bien l'oxydation biologique, nous avons utilisé deux inoculums représentant deux cultures mixtes bioaugmentées. Ces cultures mixtes sont dites *bioaugmentées*, ce qui signifie que le fournisseur aensemencé les populations bactériennes choisies sur des milieux nutritifs contenant des concentrations croissantes de PCP. Elles ont été ainsi adaptées à utiliser de grandes quantités de l'halophénol et, l'énergie qui provient de l'oxydation de ce composé organique toxique est requise pour que les microorganismes remplissent leur fonction essentielle. Les cultures mixtes nous ont été fournies par la compagnie Kam Biotechnology.

La première communauté bactérienne baignait dans son milieu nutritif. Elle a été mise en contact avec la pâte contaminée au temps $t = 0$ h, après un délai de 8 heures nous avons inoculé le système avec la deuxième communauté bactérienne. Ce deuxième groupe microbien ne contenait pas de nutriment. Un volume de milieu nutritif égal à celui de la biomasse a été ajouté au système. Par la suite, nous avons réinoculé tous les cinq jours avec ce deuxième groupe microbien en y ajoutant toujours le même volume d'éléments

nutritifs. Cette inoculation répétée était nécessaire, suite à la charge organochlorée à traiter très élevée, et au haut niveau de toxicité du système. L'énumération des populations bactériennes, dont chacune étant une culture pure ainsi que la composition de leurs milieux nutritifs sont indiqués dans le tableau 3.3 (les spécifications des composés ne nous ont pas été révélées par les fournisseurs).

Un milieu nutritif est essentiel à la biomasse pour sa croissance. Il doit comprendre les macro-nutriments (C, H, O, N, P et S) nécessaires à la reconstruction de toutes les cellules microbiennes. D'autres éléments sont également requis mais à l'état de trace, ce sont les micronutriments (Na, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Co, Mo, Br, Se, Ag, Au). La croissance microbienne nécessite d'abord de l'énergie chimique provenant de l'oxydation de molécules organiques, et également des nutriments pour que les populations bactériennes utilisent le PCP comme une source de carbone (53). Le rapport C/N optimum pour les populations bactériennes sélectionnées est de 10/1 (maximum 20/1). Un activateur a été ajouté au milieu nutritif par Kam Biotechnology dans le but d'accélérer la digestion de la matière organique et de permettre une stabilité de l'activité microbienne. L'activateur est une autre source de carbone qui est cométabolisé.

Lors de l'application d'un traitement, il est important de connaître les substances qui sont toxiques pour les populations bactériennes utilisées. Dans le tableau 3.4, on retrouve les composés et les éléments toxiques pour les souches microbiennes de Kam Biotechnology. La tolérance maximale représente le seuil de toxicité, il correspond à une concentration qui provoque une inhibition partielle ou totale de l'activité microbienne. Il faut également tenir compte de la forme sous laquelle les substances se présentent dans le milieu qui, à des concentrations données (seuil de toxicité) deviennent toxiques pour les populations bactériennes.

TABLEAU 3.3 La description des deux inoculums et de leurs milieux nutritifs

	<i>inoculum no 1</i> <i>commerciallement</i> <i>appelé Biozyme 2500</i>	<i>inoculum no 2</i> <i>commerciallement</i> <i>appelé Biozyme B-52</i>
populations bactériennes (cultures pures)	1. Flavobacterium sp. 2. Arthrobacter sp. 3. Pseudomonas aeruginosa	1. Rhodococcus chlorophenolicus 2. Pseudomonas putida 3. Pseudomonas aeruginosa 4. Bacillus subtilis 5. Arthrobacter sp.
milieu nutritif	1. H ₂ O 2. Placenta 3. Polyéthylèneglycol	1. Azote stabilisé 2. Urée grade 46/0/0 3. Phosphate d'ammonium monobasique 4. Phosphate d'ammonium dibasique
activateur	Kérosène	chlorure de lysosyme

TABEAU 3.4 **Seuils de toxicité des composés et éléments toxiques pour les populations bactériennes utilisées dans la biodégradation du PCP**

<i>composés et éléments toxiques</i>	<i>tolérance maximale (ppm)</i>
cyanure organique	trace
cyanure inorganique	trace
chrome hexavalent	trace
arsenic	1000
plomb	1270
aluminium	4000
cadmium	800
fer	3000
mercure	500
sodium	10 000

3.2.1 Dosage de l'oxygène dissout (OD)

Au cours de la biodécontamination, nous avons vérifié régulièrement dans les réacteurs, le pH de la pâte imprégnée et l'oxygène dissout. Hebdomadairement, la teneur en azote et en phosphore doit être déterminée dans les milieux puisque la biomasse incorpore en grande quantité ces substrats dans ses membranes cellulaires pour sa croissance.

L'ajustement du pH (6.9-8.9) dans les bioréacteurs a été effectué soit avec du NaOH, soit avec de l'acide acétique selon le cas.

La mesure de l'oxygène dissout a été effectuée à l'aide d'un électromètre à oxygène de la compagnie YSI, de modèle 50B, muni d'une électrode spécifique à oxygène avec une membrane perméable aux gaz.

Après calibration, l'électrode spécifique était simplement immergée dans le surnageant aqueux de la pâte traitée.

3.2.2 Dosage de l'azote

Le dosage de l'azote ammoniacal a été effectué par la méthode normalisée 8038 de "Water analysis handbook" de Hach.

La détermination de l'azote ammoniacal nécessite une étape de distillation et elle est basée sur la méthode colorimétrique de Nessler. Le principe consiste en l'utilisation d'un stabilisateur minéral qui se complexe fortement dans l'échantillon et à l'utilisation d'un agent dispersant (alcool polyvinylique) qui aide à la formation de coloration. Une couleur jaune se développe proportionnellement à la concentration d'azote ammoniacal.

Nous avons également effectué le dosage de l'azote total Kjeldahl qui utilise aussi la procédure Nessler (méthode 8075) de Hach.

Le terme azote total Kjeldahl correspond à l'azote organique où l'azote est fortement lié aux composés organiques, et à l'azote ammoniacal qui représentent les formes réduites de l'azote. L'azote sous la forme réduite est converti en sel d'ammonium par l'action de l'acide sulfurique et du peroxyde d'hydrogène au cours d'une digestion.

Nous n'avons pas déterminé la quantité d'azote sous formes oxydées que sont l'azote nitreux (N-NO_2^-) et l'azote nitrique (N-NO_3^-). Le terme azote global, fréquemment utilisé correspond à la somme des formes réduites et oxydées.

3.2.3 Dosage du phosphore

Le dosage de l'orthophosphate a été effectué par la méthode standard 8048 de "Water analysis handbook" de Hach.

Le dosage de l'orthophosphate, appelé aussi phosphate réactif, a été effectué selon la méthode colorimétrique PhosVer 3 (Hach) à l'acide ascorbique où l'orthophosphate réagit avec le molybdate présent dans le milieu acide pour produire un complexe phosphomolybdate. L'acide ascorbique réduit ensuite le complexe, donnant une coloration bleu intense.

Nous avons également dosé le phosphore total selon la méthode avec une digestion au persulfate acide, selon la méthode 8190 de "Water analysis handbook" de Hach, où les phosphates organiques et inorganiques condensés sont convertis en orthophosphate réactif avant l'analyse. Un prétraitement de l'échantillon avec de l'acide et de la chaleur fournit les conditions nécessaires à l'hydrolyse des formes inorganiques condensées. Les phosphates organiques sont transformés en orthophosphate par la chaleur avec l'acide et le persulfate. Le dosage de l'orthophosphate avec l'acide ascorbique est effectué par la suite.

Les résultats incluent le phosphate organique et le phosphate inorganique, lesquels correspondent à l'orthophosphate et au phosphate hydrolysable à l'acide.

Les résultats sont exprimés en concentration (mg/L) de PO_4^{3-} ou en concentration (mg/L) de P.

3.3 Détermination des chlorophénols par chromatographie capillaire de partition gaz liquide

Nous avons considéré qu'il était plus utile de mettre au point l'identification de tous les isomères chlorophénolés plutôt que de se restreindre uniquement à celle du PCP; puisque la solution de PCP imprégnant les poteaux de pin gris est de qualité technique. La solution contient d'autres chlorophénols et leur quantification permet une description plus complète du déchet dangereux.

La séparation des 19 chlorophénols dont on retrouve la liste au tableau 3.5; a été effectuée avec des solutions standards de chlorophénols de la compagnie UltraScientific dont le degré de pureté est de 95 %.

La détermination quantitative du PCP s'est effectuée par l'intégration des surfaces des pics obtenus sur un chromatogramme. La méthode de calcul des résultats, est celle du standard interne qui est reconnue comme une méthode très précise. Le standard interne (SI) est de préférence un analogue structural du composé à analyser. Le SI choisi est le p-DCB de Fisher.

Le traceur, servant à déterminer le pourcentage de récupération, est un composé de structure semblable et de comportement similaire au PCP. Le traceur qui a été utilisé est le composé 2,4,6-TBP de la compagnie Fisher.

TABEAU 3.5 Les standards externes de chlorophénols, le standard interne (SI) et le traceur

<i>standards de chlorophénols</i>	<i>abrégations</i>
pentachlorophénol	PCP
2,3,4,5-tétrachlorophénol	2,3,4,5-TTCP
2,3,4,6-tétrachlorophénol	2,3,4,6-TTCP
2,3,5,6-tétrachlorophénol	2,3,5,6-TTCP
2,3,4-trichlorophénol	2,3,4-TCP
2,3,5-trichlorophénol	2,3,5-TCP
2,3,6-trichlorophénol	2,3,6-TCP
2,4,5-trichlorophénol	2,4,5-TPC
2,4,6-trichlorophénol	2,4,6-TCP
3,4,5-trichlorophénol	3,4,5-TCP
2,3-dichlorophénol	2,3-DCP
2,4- dichlorophénol	2,4-DCP
2,5- dichlorophénol	2,5-DCP
2,6- dichlorophénol	2,6-DCP
3,4- dichlorophénol	3,4-DCP
3,5- dichlorophénol	3,5-DCP
2-chlorophénol	2-CP
3- chlorophénol	3-CP
4- chlorophénol	4-CP
* 1,4-dichlorobenzène	p-DCB (SI)
* 2,4,6-tribromophénol	2,4,6-TBP (traceur)

Le diluant servant à la préparation des solutions-étalons de composés phénoliques, de la solution de standard interne et de la solution du traceur est du dichlorométhane (DCM).

Les solutions de standards externes, interne et du traceur ont été préparées et entreposées dans des contenants de verre exclusivement. Les solutions ont été conservées pour la durée des analyses à 0 °C.

Tous les composés analogues de la famille du chlorophénol ont été séparés par CGL / DCÉ, selon les conditions chromatographiques présentées dans le tableau 3.6. Le chromatographe en phase gazeuse utilisé est de modèle 3600 de Varian avec comme système d'exploitation des données, le logiciel Star (versions A-2 et 4.0). Le CG est équipé d'un injecteur de type "split-splitless" et d'un détecteur DCÉ avec l'isotope ⁶³Ni. Le système est également doté d'un échantillonneur automatique de modèle 8100. La colonne à chromatographie est une colonne capillaire DB5.625 de J & W Scientific de 30 m de long, 0.25 mm de diamètre interne et de 0.50 µm d'épaisseur de film et dont la phase stationnaire (5 % diphényldiméthylpolysiloxane) est liée de façon covalente à la silice fondue, laquelle tapisse la face interne du tube capillaire en polyimide. Les températures limites de la colonne sont de -60 à 325 °C en mode isocratique et 350 °C en mode gradient. La colonne est recommandée pour les composés organochlorés selon les méthodes normalisées de EPA (Environmental Protection Agency), destinées à l'analyse de composés organiques chimiques d'eaux usées industrielles et municipales.

Les échantillons de PCP à analyser que nous avons extrait étaient très concentrés; de fortes dilutions préalables à l'injection s'avéraient plus pratiques. Le "split ratio" était de 1:10 (tableau 3.6), le 1/10 du volume total d'échantillon

TABLEAU 3.6 Conditions chromatographiques par CGL/DCÉ
lors de l'étalonnage

température de l'injecteur (°C) (mode isotherme)	280
mode d'injection	"split"
"split ratio"	1:10
volume d'injection (µL)	1.0
vitesse d'injection (µL/min)	10.0
<u>rampe de température de la colonne:</u>	
température initiale du four (°C)	35
temps initial (min)	5
taux d'augmentation de température (°C/min)	8
température finale du four (°C)	300
temps final (min)	25
temps d'équilibre (min)	2
débit du gaz vecteur (mL/min)	2.4
vitesse linéaire du gaz vecteur (cm/sec)	44.6
pression dans la colonne (psi)	22.2
débit du gaz complémentaire (mL/min)	27.6
température du détecteur (°C)	300
sensibilité du détecteur	1 (sensibilité maximale)

injecté élué à travers la colonne tandis que les 9/10 restants de la solution de PCP migrent vers l'évent.

La température de l'injecteur doit de préférence être à une température assez élevée pour que chaque soluté ait une pression de vapeur suffisante pour être élué dans un temps raisonnable. La température du détecteur doit être supérieure à celle de la colonne pour que tous les solutés soient à l'état gazeux dans la chambre du détecteur.

L'hélium a été employé comme gaz vecteur et l'azote comme gaz complémentaire. Les deux gaz sont de grade UHP ("ultra high purity"). Le débit du gaz vecteur est dépendant de la température de la colonne. Avec l'augmentation de la température du four, le débit diminue alors que la pression dans la colonne demeure constante. Ceci est dû au type d'injecteur employé ("split-splitless"). Le débit du gaz vecteur que l'on retrouve au tableau 3.6 est celui qui a été fixé à la température initiale du four soit à 35 ° C.

3.4 Extraction du PCP à partir d'un solide

Nous avons extrait le PCP à partir des vieux poteaux de pin gris sous forme de copeaux et de pâte thermomécanique.

En nous basant sur la méthode proposée par ACPP (méthode G31P) pour extraire les matières extractibles; les copeaux ont d'abord été moulus afin de les réduire en bâtonnets (10 mesh) pour certains et en poudre (40 mesh) pour d'autres. Cette réduction de dimensions nous a permis d'accroître la surface spécifique afin d'extraire le PCP le plus efficacement possible. Ces deux diamètres de copeaux nous ont permis de vérifier l'efficacité de la méthode en fonction des dimensions.

L'extraction du PCP s'est effectuée dans des soxhlets contenant chacun 3 g de chaque échantillon soit, les copeaux de pin gris de 10 mesh, de 40 mesh, la PTM prélevée du bioréacteur-témoin, de même que celle traitée à différents temps d'action provenant des trois bioréacteurs contenant les inoculums.

Les copeaux de pin gris ont été séchés au four à 60 °C pour une période de 12 heures (siccité de 92 %). Les échantillons de PTM témoins et ceux traités; ont été séchés à la température de la pièce (siccité de 94 %) avant d'y extraire le PCP au soxhlet.

Une quantité de traceur (2,4,6-TBP) s'échelonnant entre 50 à 500 ppm; selon que l'échantillon était en copeaux ou en pâte; a été ajoutée à chaque échantillon sec.

Le solvant d'extraction utilisé était le DCM, l'extraction au soxhlet correspondait à 15 à 20 cycles du solvant..

Le DCM a été par la suite évaporé à sec par entraînement sous un jet d'azote. Les échantillons de PCP extraits ont été remis en solution dans des volumes bien définis de DCM et dilués pour le dosage du PCP.

Les échantillons de PCP extraits ont été congelés pour les analyses chromatographiques qui n'excédaient pas 20 jours après l'extraction.

3.5 Extraction du PCP à partir d'un liquide

Des aliquots de pâte ont été prélevés dans le bioréacteur-témoin et dans les trois bioréacteurs contenant des masses croissantes (100 g, 200 g, 400 g) de PTM de pin gris imprégnée de PCP.

Les aliquots de pâte échantillonnés ont été filtrés et le filtrat correspondant à chaque aliquot de pâte a été analysé pour son contenu en PCP.

L'extraction du PCP à partir des filtrats aqueux s'est effectuée selon la méthode de Mueller et al. (54). Nous avons modifié cette méthode en se basant sur la procédure de EPA-US no. 6420 B.5. En premier lieu, les filtrats aqueux, auxquels le traceur (2,4,6-TBP) a été ajouté, ont été alcalinisés avec du NaOH 1N. Cette étape est une étape de nettoyage car ce ne sont, en principe, que les composés chlorophénoliques qui passent sous forme ionisée. Par la suite, les filtrats ont été acidifiés à $\text{pH} = 2$ avec de l'acide sulfurique concentré, de sorte que le pH de la phase aqueuse soit nettement inférieur au pK_a du PCP ($\text{pK}_a = 4.71$) et par conséquent le PCP soit sous forme non ionisée.

Dans la seconde étape, les filtrats subissent une extraction liquide/liquide à trois reprises avec du DCM, en utilisant un volume égal de solvant organique à celui du filtrat. Le PCP et ses isomères montrant plus d'affinité pour la phase organique.

L'eau résiduaire que pouvait contenir la phase organique a été éliminée en passant la solution de DCM à travers une couche de sulfate de sodium anhydre.

Le PCP a également été extrait à partir de la solution liquide provenant du traitement à la vapeur lors du pré-traitement des copeaux avant le raffinage de ceux-ci (figure 3.1).

Nous avons effectué l'extraction du PCP à partir de cette solution biphasique récupérée. Dans un premier temps nous avons extrait le PCP à partir de la fraction aqueuse sous les mêmes conditions que celles décrites pour l'extraction du PCP à partir des filtrats aqueux. En second lieu, nous avons

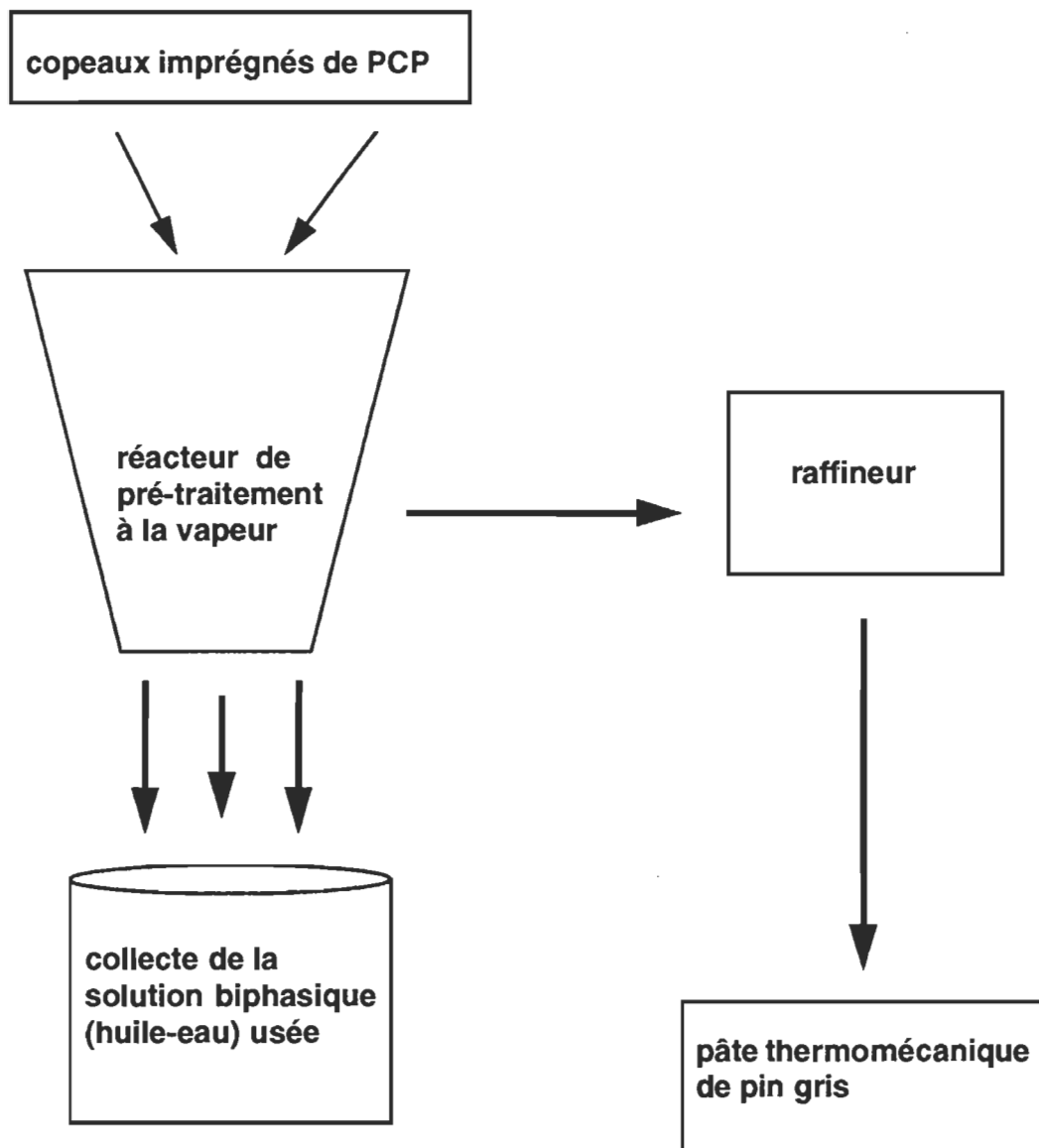


FIGURE 3.1 Point d'échantillonnage de la solution biphasique

extrait le PCP à partir de la fraction huileuse de la solution biphasique. Nous avons effectué une extraction liquide/liquide en ajoutant à la phase organique une solution alcaline de NaOH 1N (phase la plus dense). L'extraction a été répétée à trois reprises. Par la suite, la solution alcaline contenant le PCP-Na a été acidifiée à pH=2, puis refroidie à la température ambiante. On procède par la suite à l'extraction liquide/liquide en ajoutant un volume équivalent de DCM à celui de la solution aqueuse acide contenant le PCP non ionisé. La solution de DCM contenant le PCP a été récupérée et asséchée sur un lit de sulfate de sodium anhydre avant de subir les mêmes étapes que celles ci-haut mentionnées pour le dosage du PCP par CG.

3.6 Analyse qualitative par CGL/SM d'échantillons de PCP extrait

Pour s'assurer que le composé extrait des divers échantillons (copeaux, PTM, liquides aqueux et organiques) correspond véritablement à la molécule de PCP, nous avons fait une analyse qualitative par CGL/SM suivant les conditions d'opération décrites au tableau 3.7.

Le chromatographe en phase gazeuse qui a été utilisé est de modèle 5890 de la série II de Hewlett-Packard, avec comme système d'exploitation des données, le logiciel HPCHEM (version B.02.04). Le CG est équipé d'un injecteur de type "split-splitless" et d'un autoéchantillonneur de modèle 7673 qui est capable d'exécuter les injections à une vitesse très élevée (55). Le CG est couplé à un spectromètre de masse. Le système de détection utilisé est un détecteur de masse sélectif (MSD) de modèle 5972, de type quadrupôle, fonctionnant dans un mode d'acquisition "scan" pour l'analyse qualitative que nous avons effectuée. La méthode de bombardement pour produire un radical-cation moléculaire est la méthode d'impact électronique (IE). Le voltage appliqué au multiplicateur d'électrons est 1870.6 volts. L'étendue de masses sur lesquelles s'est effectué le balayage sont de 10 à 350 (u.m.a.) avec un compte de 150 comme seuil, au détecteur.

TABLEAU 3.7 Conditions chromatographiques par CGL/SM pour l'identification du PCP

température de l'injecteur (°C)	280
(en mode isothermal)	
mode d'injection	"splitless"
volume d'injection (µL)	2
temps de séjour (dwell time) de l'aiguille dans le port d'injection (msec)	100
<u>programme de pression de l'injecteur:</u>	
pression initiale de l'He (psi)	55
temps initial (min)	1.0
taux de diminution de pression (psi/min)	99
pression finale de l'He (psi)	7.7
temps final (min)	0.0
<u>rampe de température de la colonne:</u>	
température initiale du four (°C)	50
temps initial (min)	2
taux d'augmentation de température (°C/min)	8
température finale du four (°C)	250
temps final (min)	5.0
temps d'équilibre (min)	0.5
débit du gaz transporteur (mL/min)	1.0
vitesse linéaire (cm/ sec)	36.2
pression (psi)	7.7
température de la ligne de transfert (°C)	280
Délai pour le solvant/SM (min)	2

La colonne à chromatographie est une colonne capillaire HP-5 MS de Hewlett -Packard de 30 m de long, 0.25 mm de diamètre interne et de 0.25 μ m d'épaisseur de film et dont la phase stationnaire (5 % phényle méthyle silicone) représente le greffon de la silice fondue à la face interne du tube capillaire en polyimide. Le programme de température et de pression de la colonne que nous avons établi, est basé sur la méthode d'analyse des phénols de Firor (56) et de Hite et al. (57). Le mode d'injection par programmation de pression a été employé car les échantillons de PCP extrait n'ont pas subi d'étape préliminaire de dérivation avant d'être injecté et, dans ces conditions, l'échantillon de PCP doit avoir un temps de séjour dans l'injecteur le plus bref possible pour arriver sans perte à la tête de la colonne. L'injection à haute pression permet de rencontrer ces exigences. Il faut préciser que ce qui nous a permis d'éviter le problème de discrimination de masse et la décomposition des composés semi-volatils comme le PCP dans un port d'injection chauffé; c'est l'application combinée d'une injection en mode de programmation de pression et de l'injection particulièrement rapide exécutée par l'autoéchantillonneur. Finalement, le gaz vecteur utilisé pour la chromatographie est l'hélium.

3.7 Analyse quantitative par CGL/DCÉ d'échantillons de PCP extrait

L'analyse quantitative du PCP à partir des matrices et des liquides a été effectuée sous les conditions chromatographiques établies à la section 3.3.

Une jaquette de verre silanisée a été installée dans le corps de l'injecteur pour éviter les interactions entre le PCP et la silice de la jaquette à l'injection.

Le calcul de la concentration du PCP et de ses composés analogues de la même famille extraits à partir des solides (copeaux et PTM) a été effectué à l'aide du facteur de réponse relatif (FRR) de chacun des composés chlorophénoliques déterminé lors de l'étalonnage, et de la quantité de standard interne (Star Varian, version A-2).

La détermination de la concentration du PCP à partir d'un liquide (filtrats aqueux des aliquots de pâte et solution d'imprégnation usée récupérée) a été effectuée à l'aide d'une courbe de calibration avec la méthode du standard interne (Star Varian, version 4.0). Il est à noter que nous avons employé deux méthodes de calcul différentes lors d'analyses quantitatives d'échantillons de PCP extrait par CGL/DCÉ, car nous avons utilisé une version mise à jour.

3.8 Caractérisation des filtrats aqueux des aliquots de pâte par analyses spectroscopiques et par méthode électrométrique

Pour accroître notre compréhension du phénomène biologique, nous avons dosé les matières organiques et les carbones inorganiques des filtrats aqueux des pâtes échantillonnées dans les bioréacteurs #2 et #3 seulement. Quant au traitement que nous avons effectué avec le bioréacteur #1, ce premier avait pour but d'établir sur quel laps de temps convenable devait s'effectuer la décontamination biologique de la pâte imprégnée.

3.8.1 Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO) des filtrats aqueux

Le dosage de la matière organique oxydable chimiquement a été effectué selon une méthode approuvée de la compagnie Hach basée sur les méthodes normalisées de EPA.

La valeur de DCO d'un filtrat diffère de celles de la DBO_5 et du COT.

Elle est supérieure et il y a un rapport de l'ordre d'environ 2 relatif à la DBO_5 et d'environ 2.5 relatif au COT. La DCO nous a fourni une estimation de la DBO_5 , et du COT pour la calibration.

3.8.2 Détermination de la demande biologique en oxygène (DBO_5) des filtrats aqueux

Le dosage de la matière organique biologiquement oxydable est basé sur la méthode normalisée H.2 de TAPPI. Nous avons évalué la DBO_5 des filtrats aqueux correspondant aux échantillons de pâte des bioréacteurs #2 et #3.

La mesure de l'oxygène dissout (OD) a été effectuée à l'aide d'un oxygénomètre de Orion de modèle 860, doté d'une électrode spécifique avec membrane perméable au gaz.

Les échantillons de filtrat aqueux ont été conservés au congélateur dans des contenants plastifiés durant une période de 72 heures avant l'évaluation de la DBO_5 .

3.8.3 Détermination du carbone total (CT), du carbone organique total (COT), du carbone inorganique (CI) et du carbone organique non purgeable (CONP) des filtrats aqueux

À l'aide d'un analyseur à COT à haute température de Rosemount Analytical Inc., division Dohrmann de modèle DC-190, nous avons dosé le CT, COT, CONP et le CI des filtrats aqueux correspondant aux aliquots de pâte des bioréacteurs #2 et #3.

La solution standard d'étalonnage était une solution de phtalate acide de potassium contenant 200 ppm de carbone organique. Lors de la dilution de nos échantillons, nous avons ajouté 1 ml d'acide phosphorique à 20 % puis agité fortement la solution de façon à transformer les carbones inorganiques (carbonates et bicarbonates), en CO_2 libre. La température de combustion de l'appareil était de 680°C .

Le dosage du carbone organique total (COT) a été obtenu par soustraction du carbone inorganique (CI) au carbone total (CT).

Pour déterminer le CONP, les filtrats ont été acidifiés avec de l'acide phosphorique à 20 %. Les échantillons ont ensuite été barbotés avec de l'air pendant quelques minutes pour expulser le CO_2 des filtrats provenant de la transformation des carbones inorganiques. Le carbone restant ainsi mesuré est le COT, lequel inclus le COP et le CONP. Puisque le COP tend vers zéro car il est volatile et considérant le barbotage des échantillons l'ayant entraîné dans l'atmosphère; le carbone organique restant dans les échantillons de filtrat est le CONP.

3.8.4 Bio-essais de toxicité Microtox des filtrats aqueux

La mesure de la toxicité des filtrats aqueux des pâtes des bioréacteurs

#2 et #3 a été effectuée par essais biologiques Microtox avec l'analyseur de toxicité de la compagnie Microbic de modèle M-500.

Le test comporte un réactif bactérien, une solution de reconstitution, une solution servant à ajuster la pression osmotique et un diluant.

Le réactif bactérien est composé de populations bactériennes luminescentes. La solution de reconstitution sert à solubiliser le réactif bactérien. La solution permettant une pression osmotique adéquate est ajoutée à chaque échantillon de filtrat en début de test.

Nos échantillons de filtrats aqueux ont tous subi une dilution primaire de l'ordre de 200 à 100 avant l'analyse.

Avant chaque série de mesures de toxicité, le système était évalué à l'aide d'une solution standard de sulfate de zinc à 100 ppm. Les échantillons de filtrat ont été conservés au réfrigérateur pour un maximum de temps de 24 heures avant l'analyse.

3.9 Blanchiment par voie biologique de la PTM de pin gris non imprégnée

En seconde partie de notre étude, nous avons vérifié un deuxième phénomène biotique qui est le blanchiment de la pâte. Pour ce faire nous avons utilisé le même type de pâte issue de la même essence (PTM de pin gris). Le délai entre la coupe de l'arbre et la mise en pâte était de quelques jours seulement. La mise en pâte a été effectuée avec la totalité de l'arbre excluant l'écorce.

Pour déterminer l'efficacité de notre système microbien en terme de blanchiment sur la pâte, nous avons utilisé un bioréacteur aérobie en mode

discontinu dont les conditions d'aération et d'inoculation sont les mêmes que celles mentionnées dans le tableau 3.2.

Les essais ont été effectués sur des masses de pâte de 200g à une consistance de 6 %.

Après différents temps de résidence dans le bioréacteur, deux échantillons de pâte ont été prélevés pour déterminer le niveau de blancheur de la pâte et le contenu en acides gras et résiniques.

3.9.1 Mesure de la blancheur ISO sur la pâte blanchie biologiquement

La détermination du niveau de blancheur ISO a été effectuée sur des formettes standards tel que précisé par la méthode E1 de l'Association canadienne des pâtes et papiers.

L'appareil utilisé pour déterminer le niveau de blancheur était le Technibrite à une longueur d'onde de 457 nm.

3.9.2 Extraction des acides gras et résiniques (AGR) à partir d'un liquide

Les filtrats aqueux obtenus après la filtration de la pâte prélevée des bioréacteurs contenaient des acides gras et résiniques. L'extraction des AGR de chaque filtrat aqueux a été effectuée selon la procédure analytique publiée par Voss et Rapsomatiotis (58).

3.9.3 Extraction des acides gras et résiniques (AGR) à partir d'un solide

L'extraction des AGR à partir de la PTM de pin gris a été effectuée selon le cheminement présenté à la figure 3.2.

Il est à noter que le solvant d'extraction est le même mélange organique acidifié qu'ont employé Lee et Peart (59). Les travaux des deux chercheurs ont montré un taux de récupération nettement plus élevé tant pour les acides gras

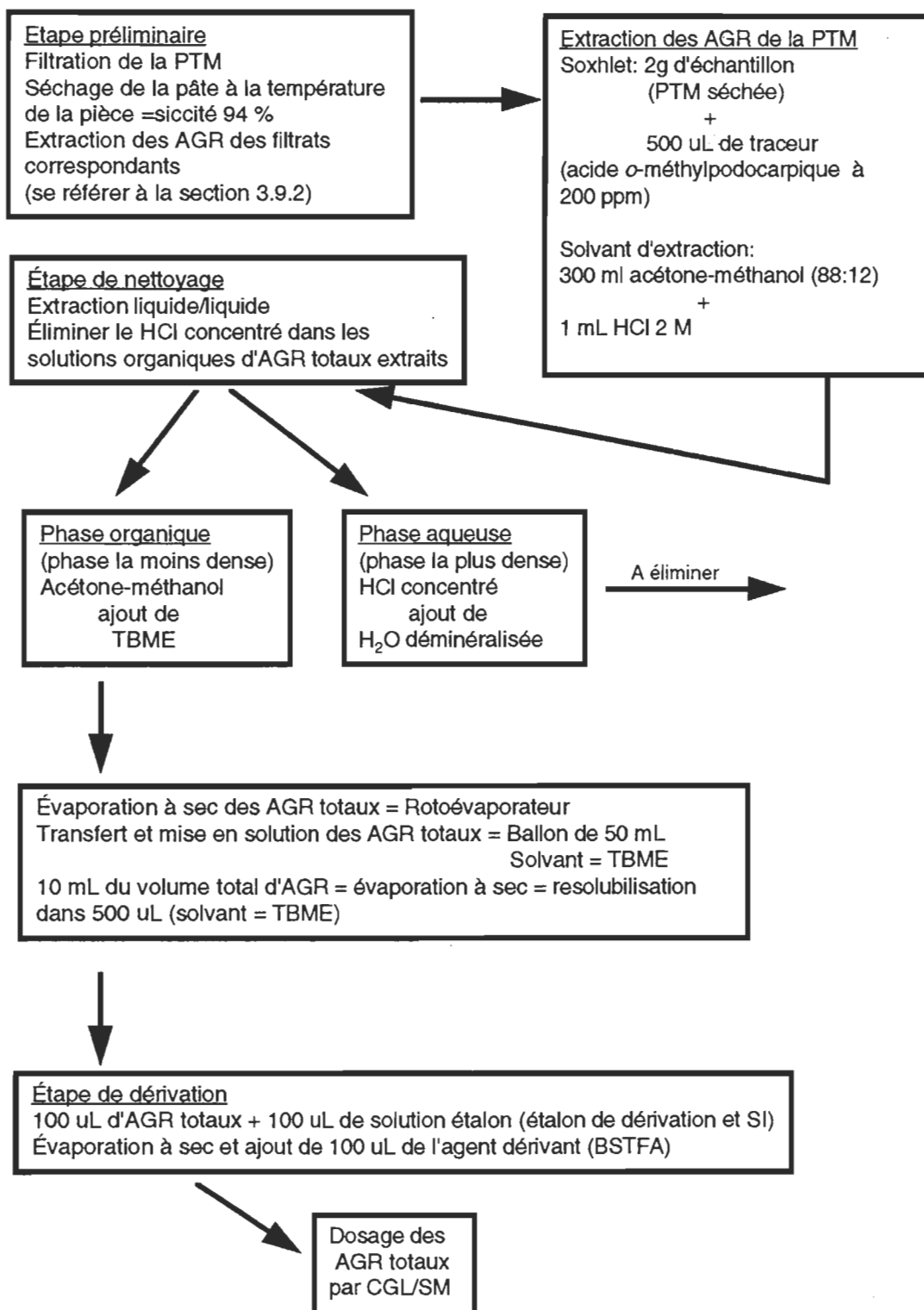


FIGURE 3.2 Extraction des acides gras et résiniques à partir d'une PTM de pin gris

que pour les acides résiniques, comparativement à d'autres solvants d'extraction moins polaires et non acidifiés.

La détermination de la concentration des acides gras et résiniques nécessite une étape préliminaire soit une dérivation avec du N-O-bis-triméthylsilyltrifluoroacétamide (BSTFA). Après le chauffage des échantillons d'AGR extraits en présence des étalons (interne et de dérivation); et l'agent de dérivation, on obtient des esters triméthylsilyle d'acides gras et d'acides résiniques.

L'acide *O*-méthylpodocarpique a été ajouté au début de la procédure d'extraction aux échantillons de pâte. Ce composé agit comme traceur afin de nous permettre d'évaluer le pourcentage de récupération des AGR extraits.

Nous avons utilisé l'acide tricosanoïque comme étalon de dérivation afin de vérifier les pertes de composés causées spécifiquement à l'étape de méthylation.

Nous avons choisi de calculer la concentration des AGR extraits à l'aide d'une courbe de calibration avec la méthode du standard interne, nous avons employé comme étalon interne l'hénicosanoate de méthyle.

Le délai de conservation des acides gras et résiniques entre l'extraction et la dérivation n'excédait pas 7 jours. L'analyse chromatographique des AGR une fois méthylés se faisait à l'intérieur de 24 heures.

3.9.4 Dosage des acides gras et résiniques (AGR) de la pâte blanchie biologiquement par CGL/SM

Le dosage par CGL/SM des AGR extraits de la PTM de pin gris blanchie par voie biologique a été effectué en se basant sur les méthodes d'analyse

relatives à l'application du Règlement sur les fabriques de pâtes et papiers (Q-2, r.12.1).

L'appareillage de Hewlett-Packard utilisé; soit le CG, l'injecteur "split-splitless", l'autoéchantillonneur, le spectromètre de masse et la colonne capillaire; est le même que celui avec lequel nous avons travaillé pour l'analyse qualitative par CGL/SM du PCP extrait (section 3.6). Les conditions chromatographiques sont détaillées au tableau 3.8.

Par différence à l'analyse qualitative du PCP (section 3.6), les injections dans le cas des échantillons d'AGR se sont effectuées à débit constant; plutôt qu'en programmation de pression; avec dans le port d'injection, un septum permanent de type merlin (efficace pour 75 000 injections).

TABLEAU 3.8 Conditions chromatographiques par CGL/SM pour la quantification des AGR

température de l'injecteur ($^{\circ}\text{C}$) (mode isothermal)	250
mode d'injection	"splitless"
volume d'injection (μL)	1
"dwell time" de l'aiguille dans le port d'injection (msec)	100
<u>rampe de température de la colonne:</u>	
température initiale du four ($^{\circ}\text{C}$)	130
temps initial (min)	0
1^{re} programmation de température ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	10
température finale 1 du four ($^{\circ}\text{C}$)	180
temps final 1 (min)	0
2^e programmation de température ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	3
température finale 2 ($^{\circ}\text{C}$)	245
temps final 2 (min)	0
3^e programmation de température ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	15
température finale 3 ($^{\circ}\text{C}$)	300
temps final 3 (min)	5
temps d'équilibration (min)	2
débit du gaz vecteur (mL/min)	1
vitesse linéaire (cm/ sec)	36.2
pression (psi)	7.7
température de la ligne de transfert ($^{\circ}\text{C}$)	250
Délai pour le solvant/SM (min)	4

CHAPITRE IV

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre traite de l'interprétation des résultats obtenus. Il se divise en trois volets: la mise au point de la méthode chromatographique de dosage du PCP, la vérification de la dégradation biologique du PCP dans une PTM de pin gris provenant de vieux poteaux de lignes téléphoniques traités et finalement, la vérification du blanchiment biologique d'une PTM de pin gris non imprégnée.

4.1 La méthode de séparation des chlorophénols par CGL/DCÉ

La compagnie Domtar utilise une solution de PCP de grade technique pour traiter les poteaux de lignes téléphoniques; en conséquent, l'imprégnant est contaminé par des chlorophénols connexes (14,13). Il était donc préférable, au départ, de mettre au point une méthode chromatographique à la fois simple et exhaustive servant à l'identification de tous les phénols chlorés existants plutôt que de se limiter seulement à la détermination du PCP; ceci afin de vérifier leur présence dans les échantillons extraits du bois traité.

Le chromatogramme de la figure 4.1 montre que nous avons pu résoudre la séparation des 19 chlorophénols, d'un standard interne (1,4-DCB) et d'un traceur (2,4,6-TBP) sans avoir à dériver les analytes d'intérêt. Les conditions d'opération chromatographiques sont présentées au tableau 3.6. L'identification de chacun des pics d'intérêt du chromatogramme de la figure 4.1 est présentée au tableau 4.1.

Il est fréquent de constater dans la littérature que l'analyse chromatographique des chlorophénols (CPs) s'effectue après une acétylation, une méthylation ou encore une estérification de ces derniers (types de réaction de dérivation les plus fréquentes en ce qui concerne les (CPs)). Les chercheurs considèrent que les composés sont plus faciles à identifier avec un détecteur tel le DCÉ qui est plus sensible et que, la désorption des composés de la colonne est facile lorsque ces derniers sont dérivés (60).

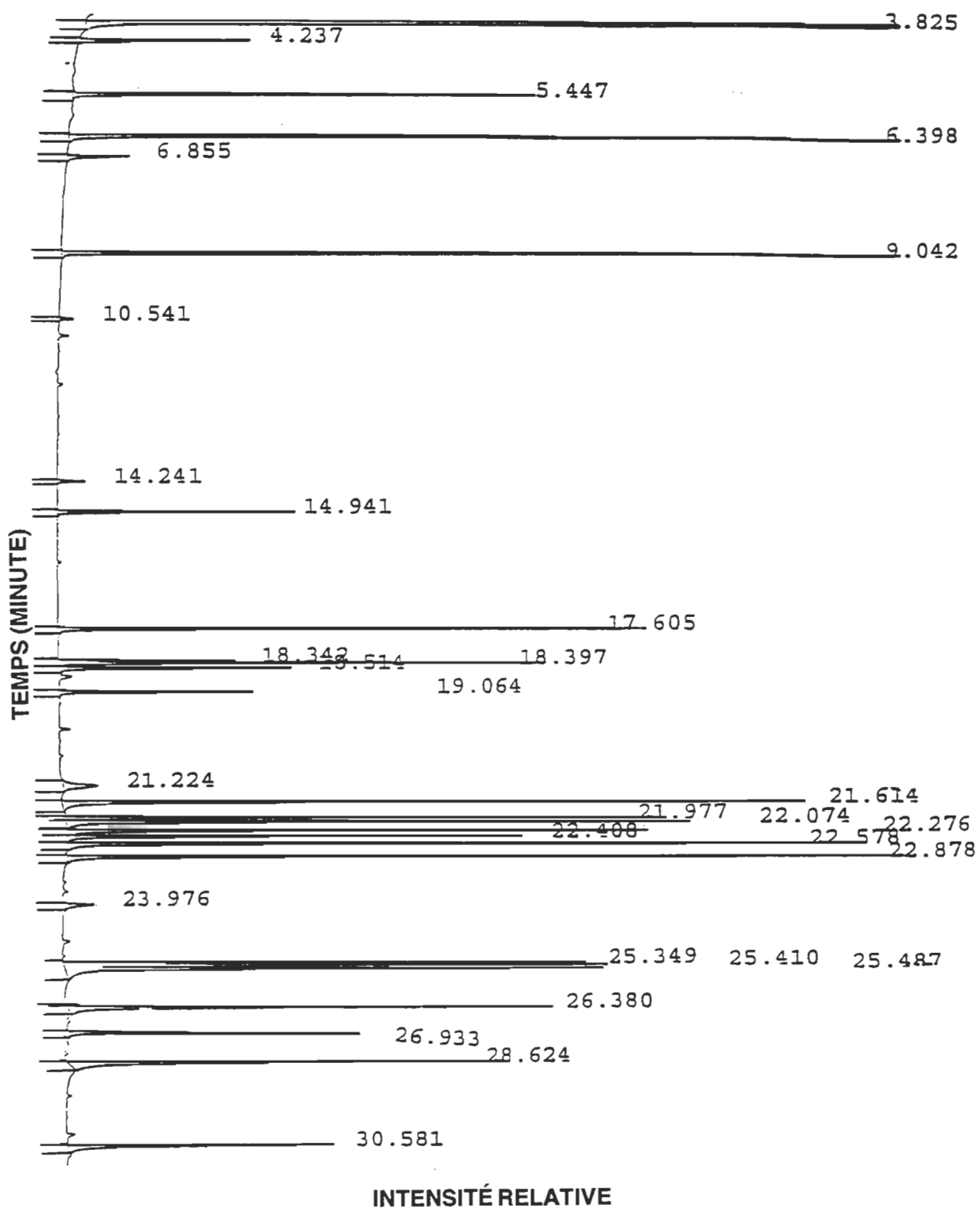


FIGURE 4.1 Le chromatogramme des standards externes de chlorophénol par CGL capillaire/DCÉ

TABLEAU 4.1 Détermination des Tr et des FRR des composés chlorophénoliques d'étalonnage et du traceur

<i>noms des pics du chromatogramme</i>	<i>Tr</i>	<i>FRR</i>	<i>concentrations (ppm)</i>
2-CP	14.241	4.6	43.860
p-DCB (SI)	14.941	1.0	50.000
2,4-DC	18.342	8.9	8.772
2,5-DC	18.397	0.3	10.965
2,3-DC	18.514	0.1	4.386
3-CP	18.800	—	43.860
2,6-DC	19.064	0.2	8.772
4-CP	21.224	—	87.719
2,3,5-TCP	21.614	0.01	0.175
2,4,6-TCP	21.977	0.01	0.274
2,4,5-TCP	22.074	0.01	0.175
2,3,4-TCP	22.276	0.01	0.274
3,5-DCP	22.408	0.2	3.654
2,3,6-TCP	22.578	0.01	0.274
3,4-DCP	22.878	0.3	21.930
2,3,5,6-TTCP	25.349	0.01	0.351
2,3,4,5-TTCP	25.410	0.009	0.351
2,3,4,6-TTCP	25.487	0.007	0.351
3,4,5-TCP	26.380	0.02	1.096
2,4,6-TBP(traceur)	26.933	0.02	2.193
PCP	28.624	0.02	0.351

Le chromatogramme de la figure 4.1 montre par la forme des pics; que l'interaction entre la phase stationnaire et les composés est bonne, les pics étant symétriques. Avec le choix de notre température finale (300 °C) et d'un temps final (25 minutes) de chromatographie que nous avons établi, un nettoyage de la colonne après une ou plusieurs injections s'est avéré inutile.

La dérivation est en fait une étape supplémentaire fastidieuse, coûteuse, et elle peut également causer un certain pourcentage de perte des composés à analyser. Par ailleurs la méthode que nous proposons offre une voie plus simple et plus rapide en éliminant la procédure de dérivation.

Une bonne procédure de laboratoire lorsque nous analysons des composés par CG, se traduit par un nettoyage de la seringue de l'autoéchantillonneur avec le solvant utilisé pour mettre en solution les échantillons à identifier. Cette procédure permet d'injecter une quantité exact du véritable échantillon et permet d'éliminer les contaminations potentielles. Paradoxalement ces mêmes procédures donnent la possibilité d'introduire une contamination, soit celle provenant des septums dans les bouchons des vials dans lesquels se retrouve les composés à injecter lors d'injections automatisées (61). Dans notre cas, nous avons utilisé des septums fabriqués de caoutchouc siliconé laminés de téflon.

Dans le chromatogramme de la figure 4.1, il y a une contamination par les septums qui se manifeste par des pics qui ne sont pas associés aux composés de nos échantillons et qu'on appelle des pics fantômes. Ces pics éluent sur une grande étendue de température et nous avons constaté qu'ils augmentent avec le nombre d'injections (les pics correspondant aux Tr de 17.605 min, 23.976 min et 30.581 min sont des pics fantômes (figure 4.1)).

Une autre source de contamination de notre système fut le solvant utilisé. Le DCM que nous avons utilisé pour nos solutions étalons comme pour nos extraits a solubilisé le phtalate contenu dans certaines pièces du chromatographe. Ce composé fait partie des pics représentant le DCM (les pics ayant les Tr suivants: 3.825 min, 4.237 min, 5.447 min, 6.398 min, 6.855 min, 9.042 min et 10 541 min. correspondent au DCM et à ses divers constituants, de même qu'au phtalate (figure 4.1)).

Le DCÉ étant un détecteur spécifique aux composés électronégatifs, sa limite de détection s'élève à 0.5 µg/L pour tous les composés, sauf pour les composés monochlorés où la limite de détection se situe à 1 ppb. La sensibilité à détecter les halophénols varie en fonction de deux paramètres, soit le niveau de chloration et pour un même nombre de chlore la position du ou des halogènes sur l'anneau phénolique. À cause d'une faible sensibilité du DCÉ par rapport aux trois monochlorophénols (MCPs), spécialement dans le cas du 3-CP et du 4-CP, il a fallu injecter des quantités très élevées de ces produits. Quoique nous avons résolu leur séparation, le chromatogramme présentait des pics asymétriques qui sont représentatifs d'une mauvaise interaction entre la phase stationnaire et les analytes d'intérêt. Selon les travaux de Lee et ses collaborateurs (60), même en dérivant les MCPs le problème de détection n'est pas solutionné. À cause d'une réponse de détection appauvrie, nous n'avons pas tenu compte des monochlorophénols dans nos travaux subséquents.

Le tableau 4.1 montre les concentrations des chlorophénols de la solution étalon en fonction des deux facteurs ci-haut mentionnés qui affectent la détection. Le tableau 4.1, présente également l'ordre d'élution des composés et les facteurs de réponse de surface (FRR) de chaque chlorophénol que nous avons établi lors de l'étalonnage. Puisque le standard interne que nous avons choisi est de structure semblable aux standards de chlorophénol nous avons obtenu des FRR différents de 1.

4.2 La biodégradation du PCP dans le bois traité

Cette section traite de l'application d'un procédé biologique sur de vieux poteaux de lignes téléphoniques traités dans le but d'examiner la dégradation du PCP.

Nous avons utilisé des communautés bactériennes pour réaliser le traitement plutôt qu'un autre groupe de microorganismes. Cette option implique que nous ne pouvons pas utiliser le pin gris imprégné de PCP à l'état copeaux, mais plutôt sous une forme telle que la surface spécifique de contact soit élevée. De cette façon, on rend l'halophénol le plus disponible possible aux populations bactériennes.

L'extraction du PCP au soxhlet à partir du pin gris imprégné non traité à l'état copeaux présente une différence d'efficacité selon les surfaces de contact. Nous pouvons constater ces différences par les concentrations de PCP qui sont présentées au tableau 4.2. Les résultats obtenus montrent qu'une extraction de PCP à partir des copeaux réduits à la taille de bâtonnets (diamètre de 10 mesh) n'est pas très efficace si on compare la teneur en PCP déterminée avec celle des copeaux réduits en poudre (40 mesh) qui est plus du double.

À cause du choix des produits finis que nous proposons de fabriquer, soit des cartons, nous avons transformé les poteaux en pâte. Pour réduire les conséquences environnementales de la fabrication des pâtes, nous avons fabriqué une pâte à haut rendement de type thermomécanique.

Dans le tableau 4.2, on constate que la concentration de PCP dans la PTM de pin gris non traitée est de loin inférieure à celle retrouvée dans les copeaux de 40 mesh. Cette faible valeur de PCP constatée dans la pâte est due à sa perte lors du processus de mise en pâte. En effet, à l'étape préliminaire du traitement à la vapeur des copeaux, la solution d'imprégnation s'est séparée en partie de la matrice de cellulose. Elle a été recueillie et analy-

TABLEAU 4.2 **La concentration de PCP dans le pin gris traité**

<i>échantillons</i>	<i>concentration de PCP (ppm) d.s</i>
copeaux imprégnés non traités (diamètre = 10 mesh)	2898 ± 348
copeaux imprégnés non traités (diamètre = 40 mesh)	6106 ± 488
PTM imprégnée non traitée	2798 ± 417
solution imprégnante usée récupérée lors de la mise en pâte Volume de la solution = 10 L (fraction huile)	3235 ± 485

sée pour son contenu en PCP (tableau 4.2).

La solution d'imprégnation usée, lorsque récupérée, était une solution biphasique (aqueuse huile).

La phase huile peut être récupérée par décantation, la phase aqueuse doit être épurée.

Il est à noter que nous avons quantifié dans les copeaux de pin gris imprégnés non traités de 40 mesh par CG/DCÉ, les chlorophénols analogues de la famille du PCP et ils étaient présents à une concentration inférieure à 1 %.

4.2.1 La dégradation biologique du PCP dans une PTM de pin gris provenant de poteaux de lignes téléphoniques traités

Pour suivre le phénomène de dégradation biologique du PCP, nous avons travaillé avec trois bioréacteurs aérobies en mode discontinu dans la première série d'expériences.

Les trois réacteurs biologiques contenaient des masses croissantes de pâte thermomécanique de pin gris imprégnée (100 g, 200 g, 400 g), à une consistance de 6 %.

Au cours de la biodécontamination, il était nécessaire de vérifier périodiquement le pH du milieu, la teneur en oxygène dissout, en azote et en phosphore; ces paramètres étant essentiels au fonctionnement efficace et rapide des consortiums.

Les valeurs obtenues suite aux dosages de l'oxygène dissout, de l'azote et du phosphore dans la phase aqueuse des bioréacteurs en fonction, n'étaient pas celles escomptées. Nous avons constaté que l'utilisation d'une sonde à oxygène était inapplicable pour doser l'oxygène dissout. La complexité du

milieu sur lequel nous avons appliqué le traitement implique qu'il était possible que des gaz interférents tels que, SO_2 , et CO aient été présents et par conséquent, aient faussé les résultats (62).

De la même façon, en déterminant la teneur en azote total Kjeldahl, ammoniacal de même qu'en dosant l'orthophosphate et le phosphate total, nous avons conclu que de procéder par des méthodes colorimétriques aboutissait à des données non fiables, même en ayant pris la précaution de distiller les échantillons non traités et traités.

Les sources d'azote susceptibles d'être utilisées par les différents microorganismes incluent toutes les sources d'azote organique et minéral. On peut estimer que l'azote constitue environ 12 % du poids sec d'une biomasse (63). Durant le suivi du système nous avons dosé les formes réduites, et non les formes oxydées de l'azote (nitrite, nitrate). Dans l'éventualité d'une poursuite du projet, il serait important de vérifier l'azote global qui tient compte de toutes les formes d'azote, tout en tenant compte du choix des procédures qui peuvent présenter des difficultés techniques.

Le phosphore représente de 1.5 à 2 % du poids sec d'une biomasse et est utilisé par les bactéries sous sa forme réactive soit l'orthophosphate (63). Les populations microbiennes utilisent également le phosphate organique, cependant le phosphate sous sa forme condensée (polyphosphates) n'est pas assimilable par les bactéries.

Les valeurs non significatives et non reproductibles d'azote Kjeldahl, ammoniacal, d'orthophosphate et de phosphate total sont attribuables à la présence de substances interférentes, telles que spécifiées par l'organisme qui a mis au point la procédure (Hach). Ces composés contribuent au

développement de coloration des méthodes spectrophométriques malgré une distillation préliminaire.

Durant le traitement, nous avons collecté des échantillons de pâte pour déterminer à l'aide de la chromatographie, la présence de PCP dans la pâte.

Le chromatogramme du total des ions (CTI) de la figure 4.2 montre un pic au T_R de 20.4 min. Le spectre de masse du total des ions analysés à 20.4 minutes contient comme masse la plus élevée et représentant l'ion parent du composé; celle de 266 (u.m.a.) qui correspond à la masse de la molécule de PCP.

La comparaison du spectre de masse obtenu à partir de l'échantillon injecté avec celui que nous retrouvons en librairie, confirme la présence de PCP (figure 4.3).

Suite à cette analyse qualitative, nous avons procédé au dosage du PCP extrait des échantillons de PTM de pin gris imprégnée. L'analyse quantitative s'est effectuée, comme déjà mentionné, par CGL/DCÉ de Varian où le traitement des données était basé sur les valeurs de FRR et sur la quantité de SI (*p*-DCB). L'emploi d'un traceur (2,4,6-TBP) pendant l'extraction, nous a permis de connaître le pourcentage de récupération du PCP. Le taux de récupération est de 46 %, il est relativement faible.

Deux principales raisons expliquent la perte considérable du PCP au cours des différentes étapes. Étant donné que le solvant de travail (DCM) est un halogénoalcane très volatil; la rotoévaporation de l'échantillon extrait avant de le solubiliser dans un volume connu pour l'injecter au CG, est une étape où il

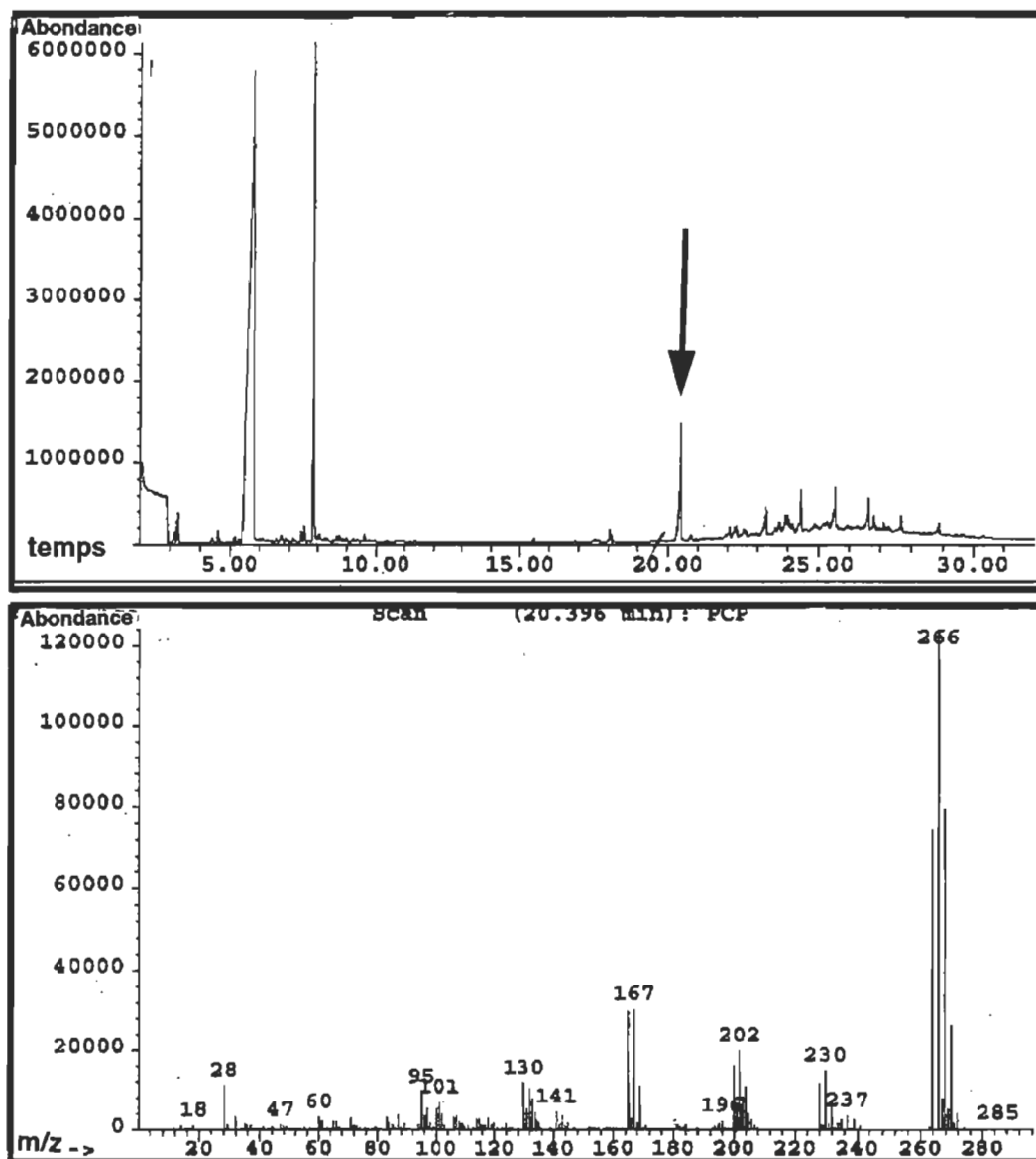


FIGURE 4.2 Le chromatogramme du total des ions (CTI) par CGL capillaire/SM d'un échantillon de PCP extrait de la pâte (en haut)
Le spectre de masse du pic représentant le PCP à 20.4 min (en bas)

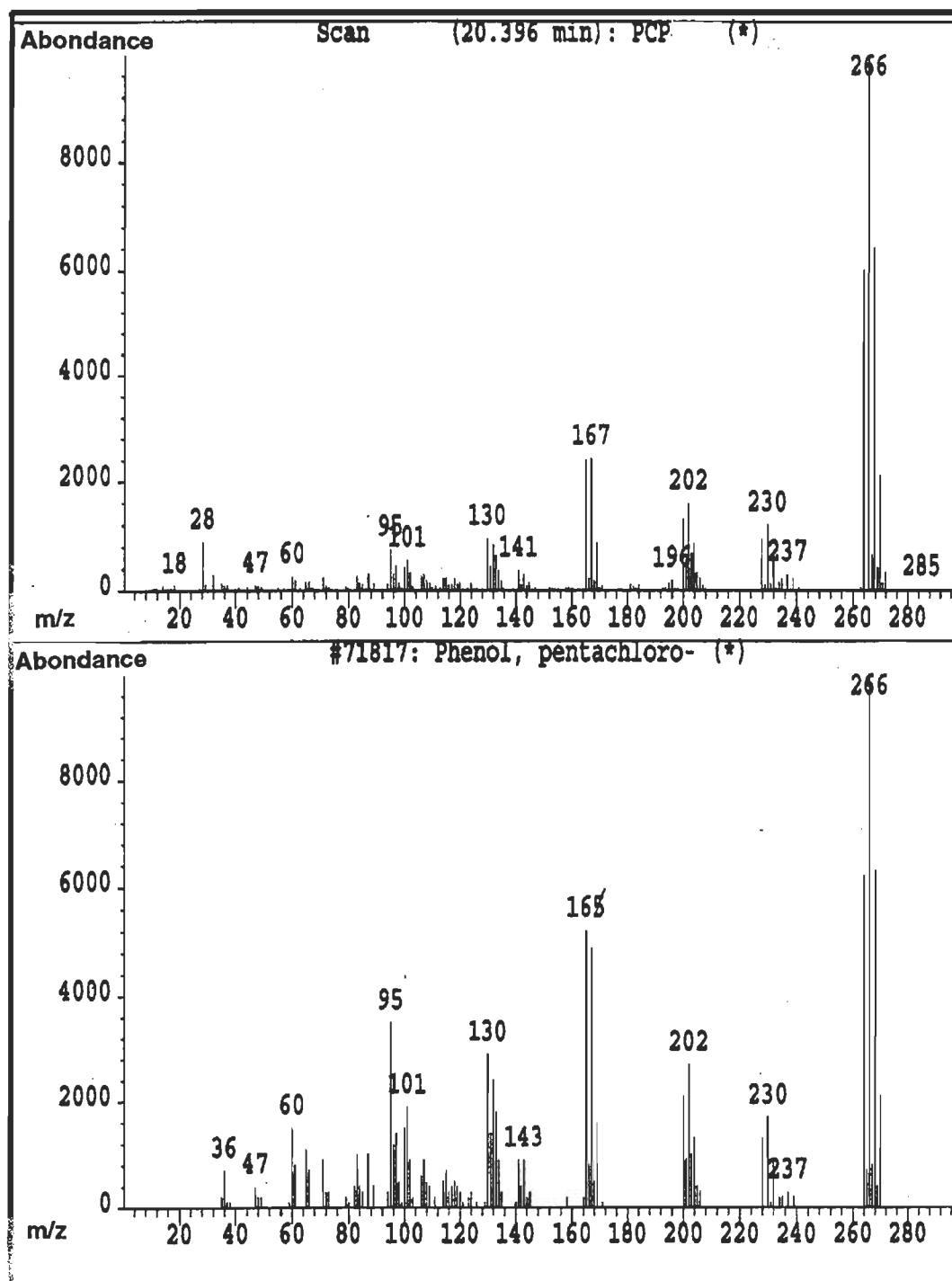


FIGURE 4.3 Le spectre de masse du PCP extrait (en haut) et l'identification du PCP en librairie (en bas)

Il y a eu probablement une certaine perte du PCP. Certains auteurs (60) emploient un solvant peu volatil pour solutionner le problème lors de l'évaporation d'échantillons à l'évaporateur rotatif. Nous n'avons pas eu l'occasion d'utiliser un tel solvant dans notre solvant de travail, car nous avons pris connaissance de cette alternative à la fin de nos travaux. L'autre cause d'une perte possible est la vitesse d'injection limitée, dans l'injecteur "split" chauffé du CG (55).

Les deux facteurs à respecter lors d'une injection automatisée en CG sont la composition de l'échantillon et le volume qui doivent demeurer inchangés par l'injection. Ces critères sont difficilement rencontrés lors d'injection dans un injecteur chauffé, puisqu'il se produit une évaporation instantanée d'échantillons résiduels dans l'aiguille de la seringue.

Quand un volume mesuré d'échantillon est prélevé dans la seringue, il y a 0.5 à 1.0 μL additionnel dans l'aiguille. L'évaporation du contenu de l'aiguille durant l'injection est causée par la chaleur provenant du port d'injection chauffé, lorsque l'aiguille demeure trop longtemps dans le corps de l'injecteur. Il en résulte que le volume injecté est en fait plus grand que le volume mesuré dans le baril de la seringue, par la quantité de solution évaporée de l'aiguille. Le processus d'évaporation est non reproductible parce que l'initiation de l'ébullition peut se produire à différents sites de nucléation sur la surface interne de l'aiguille d'une injection à l'autre. Or l'utilisateur n'a pas le contrôle sur ce processus qui relève du hasard (55).

Au cours de nos travaux nous avons injecté des extraits de PCP en utilisant toujours comme solvant du DCM. Des auteurs tels que Hite et al. (57) rapportent qu'un volume d'injection de 2 μL de DCM prend une expansion de 802 μL à 250 $^{\circ}\text{C}$. Ce phénomène est présent pour la plupart des solvants utilisés. C'est un volume beaucoup trop grand pour ce que peut offrir la jaquette

du port d'injection. *Il y a donc une perte de l'échantillon par l'évent de purge du système "split".*

Les injections automatisées que nous avons effectuées n'étaient pas suffisamment rapides; en conséquence, l'aiguille de la seringue avait un temps de résidence dans le port d'injection qui était beaucoup trop long alors elle devenait assez chaude pour évaporer son contenu. Les composés les moins volatils tel le PCP dans le mélange, ne s'évaporaient pas aussi rapidement que les chlorophénols les plus volatils et ils se décomposaient au contact du métal chaud. Ainsi immédiatement après que l'injection ait eu lieu, le mélange était évaporé et il était plus riche en composés de faibles points d'ébullition que ceux de hauts points d'ébullition. De ce fait une plus grande quantité de chlorophénols plus volatils se sont rendus à la tête de la colonne tandis qu'une quantité beaucoup moindre de composés plus lourds a été introduite dans la colonne. *C'est ce qu'on appelle une distillation fractionnelle ou discrimination de masse dans l'aiguille.* Lors du dosage des extraits, le PCP étant le composé d'intérêt et celui ayant le point d'ébullition le plus haut, celui-ci a subi la discrimination de masse la plus importante. Les résultats étaient difficilement reproductibles et c'est pourquoi le pourcentage de récupération constaté est si faible.

Lors du traitement de la PTM contaminée, l'attaque microbienne implique une cascade de réactions enzymatiques. Chaque enzyme étant spécifique à un substrat, il est donc très sélectif dans son attaque. L'oxydation biologique pourrait s'étendre sur d'autres chlorophénols car, la spécificité du site de liaison de l'enzyme (complexe substrat - enzyme) est moins élevée que la spécificité du site catalytique (lien carbone - chlore) (43). Cependant les populations microbiennes aérobies que nous avons utilisées métabolisent les phénols chlorés avec différents degrés de difficulté selon le nombre de chlores sur l'anneau phénolique.

En somme, lors de l'inoculation avec Biozyme 2500 (consortium #1), les réactions de déhalogénéation et de rupture du cycle aromatique étaient amorcées après quelques heures seulement. Les sous-produits ainsi générés dans le milieu par la conversion enzymatique, devenaient des substrats pour Biozyme B-52 (consortium #2), avec lequel nous avons inoculé après un délai de 8 heures, puis aux cinq jours.

Lors des biotraitements de PTM de pin gis contaminée, les deux communautés bactériennes (Biozyme 2500 et Biozyme B-52) ont fait face, non pas uniquement au PCP mais aussi à plusieurs composés polluants qui venaient alourdir le niveau de toxicité de la pâte (huile d'imprégnation) (9).

La pâte est une matrice solide qui rend la diffusion de l'oxygène difficile. Il est fort probable que les couches de pâte inférieures des bioréacteurs aient présenté une condition anoxique voire même anaérobique; puisqu'il était difficile d'agiter adéquatement le système. Nous avons donc sélectionné des populations bactériennes aérobies facultatives. De ce fait, le PCP a été métabolisé selon différentes voies et à un taux variable selon les endroits dans les bioréacteurs.

La figure 4.4 présente la variation de la concentration de PCP dans la pâte d'un premier bioréacteur où nous avons traité 100 g de PTM contaminée sur une longue période de neuf semaines, en échantillonnant des aliquots de pâte à des intervalles de 7 jours seulement. L'objectif était de connaître le temps de résidence où l'activité bactérienne était maximale c'est à dire la période de traitement où il y a le plus haut taux d'enlèvement de PCP.

Les résultats obtenus illustrent une réaction d'ordre 2. Au début du biotraitement on assiste à une cinétique rapide, ce qui confirme le taux élevé d'enlèvement de PCP, après quinze jours la cinétique est lente. Le taux de conversion du PCP subit un certain plafonnement. Dans la dernière portion de

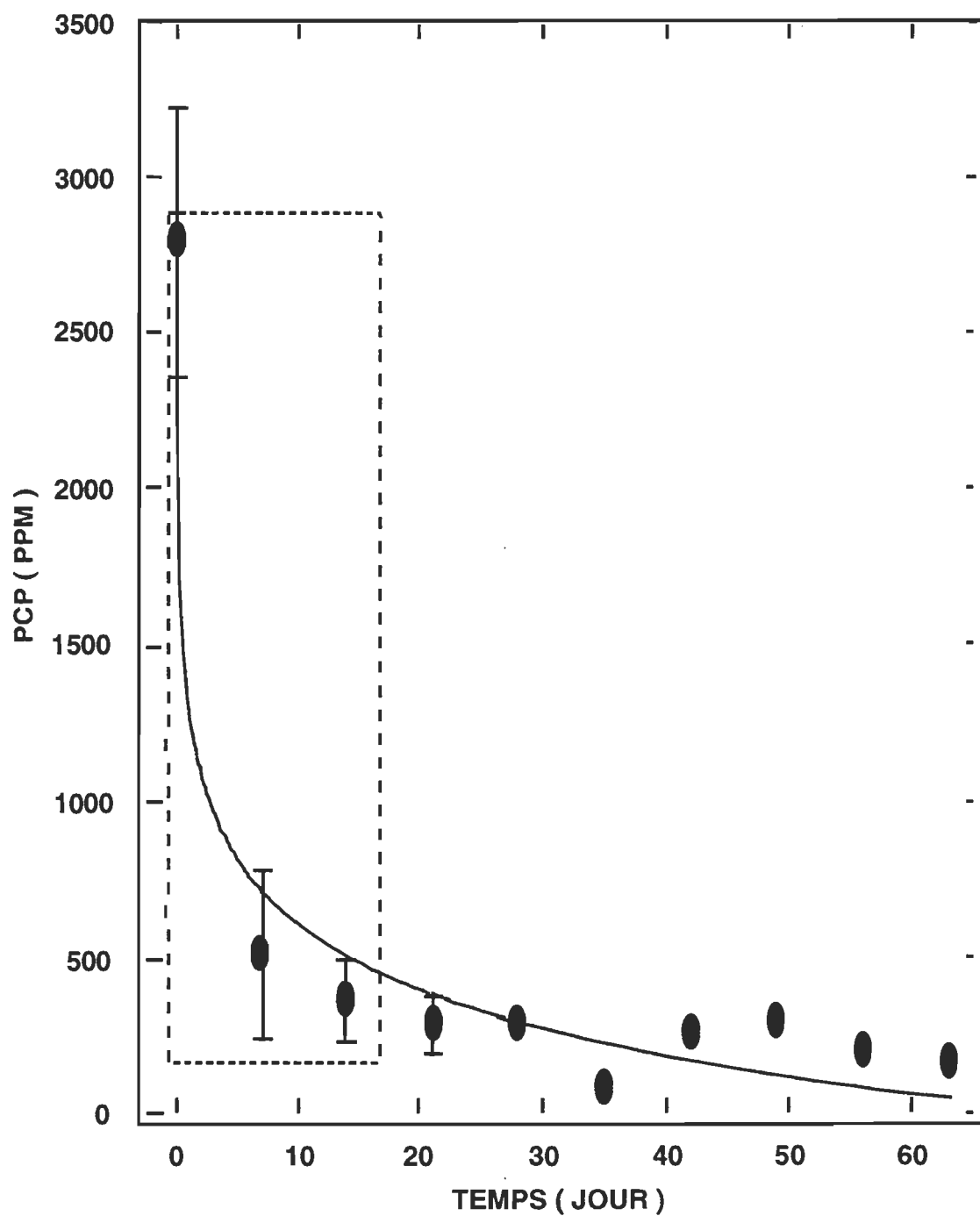


FIGURE 4.4 Variation de la concentration de PCP dans la pâte
(Bioréacteur #1)

la courbe, nous constatons que les dernières fractions du composé toxique sont difficiles à éliminer.

Un taux d'élimination de PCP de 82 % est obtenu après une semaine seulement. En augmentant le temps de résidence, il y a une baisse supplémentaire d'environ 12 %.

Suite à ces résultats obtenus avec le bioréacteur #1 (figure 4.4), nous avons échantillonné dans les bioréacteurs #2 et #3 à des intervalles de temps plus rapprochés, pour mieux connaître la cinétique, mais sur une période de temps moins longue puisque l'activité bactérienne se manifeste principalement durant les premières semaines du biotraitement.

Afin de connaître l'importance de la concentration de la pâte sur les populations bactériennes, nous avons doublé la masse dans le bioréacteur #2 et quadruplé la masse de pâte à biotraitement dans le bioréacteur #3. La quantité d'inoculum #2 avec ses nutriments lors des réinoculations aux cinq jours, a été réduite de cinq fois dans le cas des deux bioréacteurs.

Pour deux fois plus de pâte à décontaminer et cinq fois moins d'inoculum (figure 4.5), après un temps de résidence de 7 jours, la concentration de PCP a diminué de 78 %. Pour le même temps d'action, la quantité de PCP dans le bioréacteur #1 a été réduite de 82 %.

Il en est de même avec les résultats obtenus avec le bioréacteur #3 (figure 4.6). En dépit du fait que la charge polluante à décontaminer était augmentée d'un facteur de quatre, et que la biomasse de Biozyme B-52 ainsi que ses nutriments étaient cinq fois moindre, nous avons constaté un taux d'enlèvement du PCP de 75 %.

Les résultats obtenus suite aux essais avec les trois réacteurs, nous

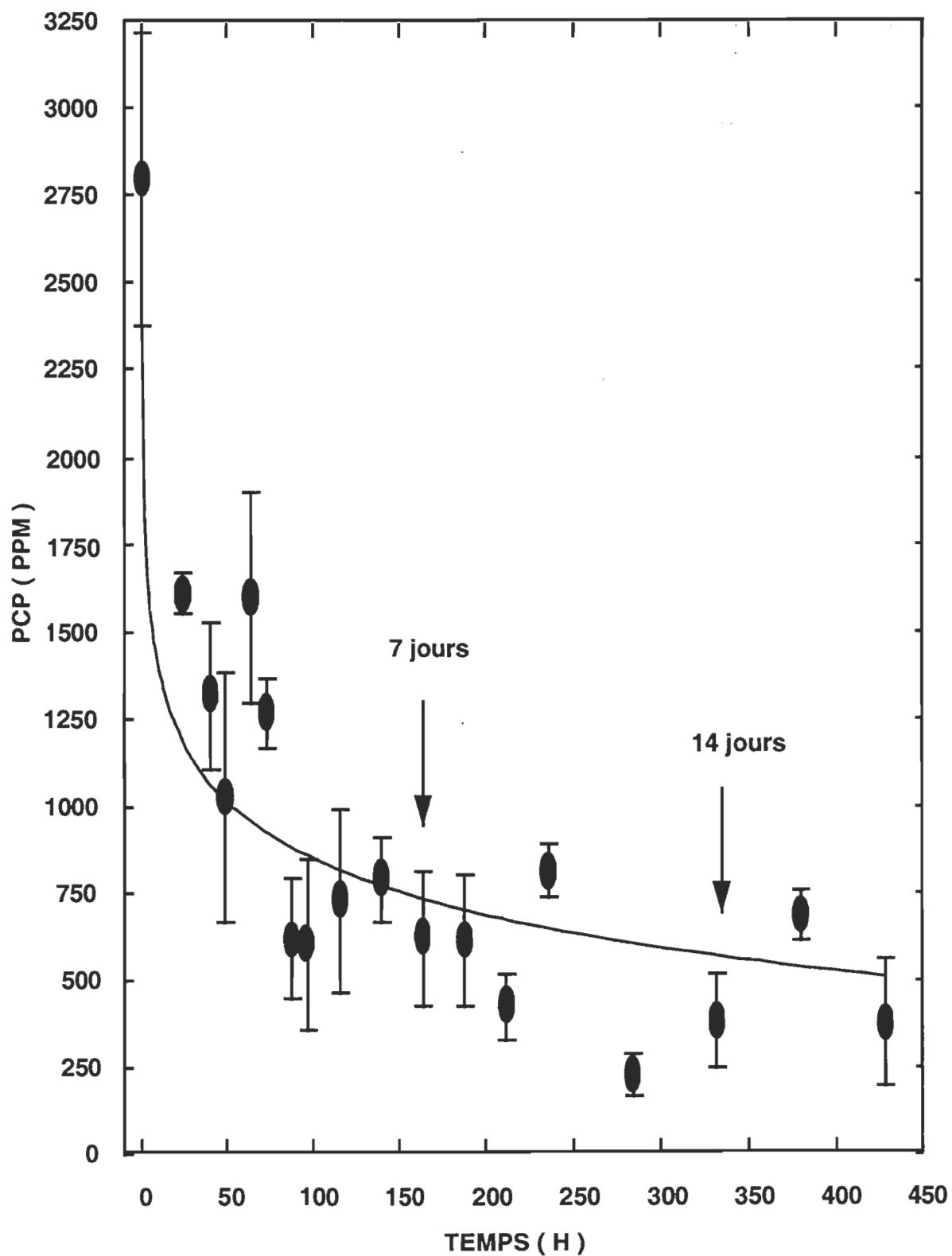


FIGURE 4.5 Variation de la concentration de PCP dans la pâte
(Bioréacteur #2)

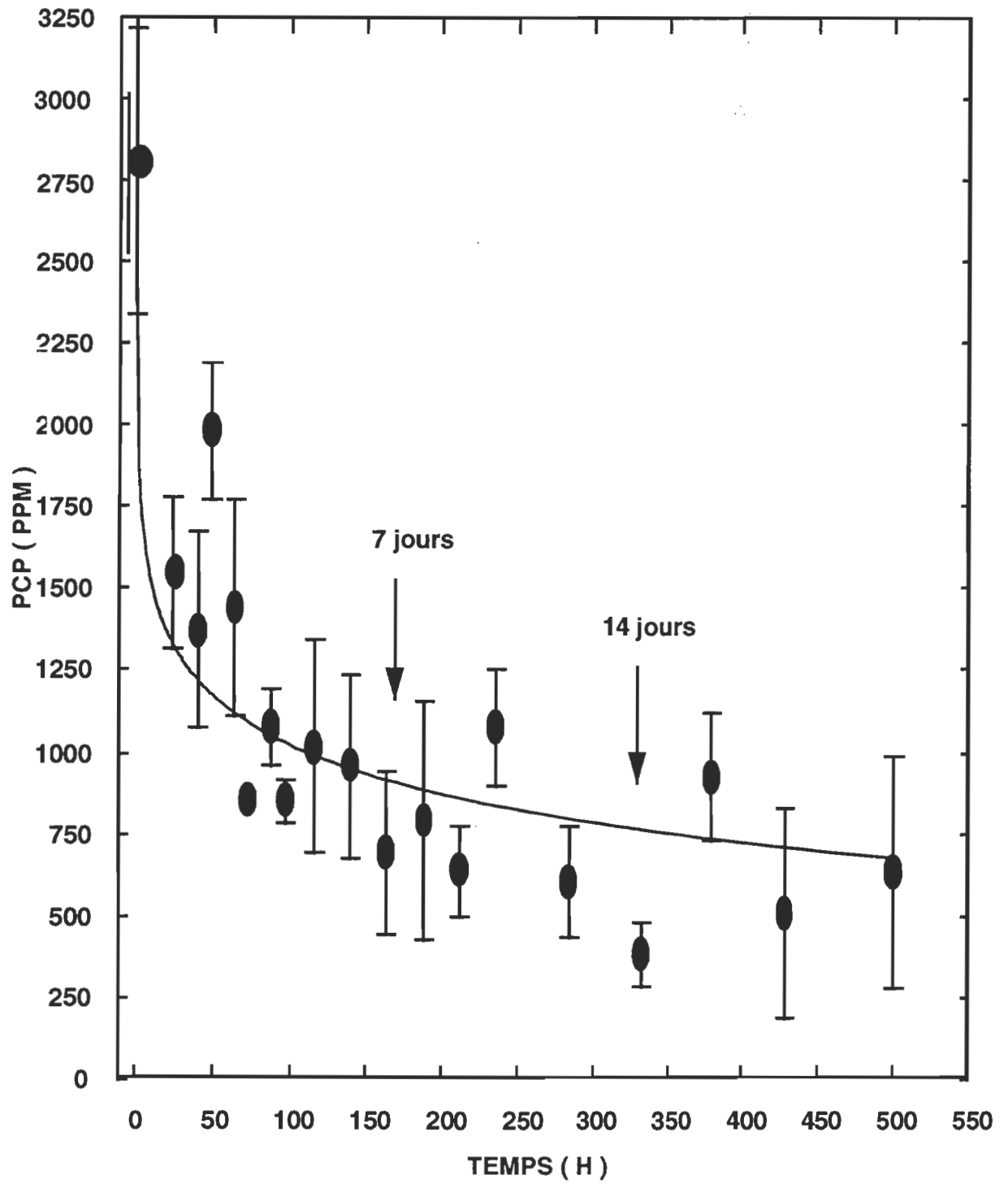


FIGURE4.6 Variation de la concentration de PCP dans la pâte
(Bioréacteur #3)

montrent que la concentration de pâte contaminée a peu d'influence sur la capacité des consortiums à convertir l'halophénol.

4.2.2 La caractérisation des filtrats aqueux correspondant aux échantillons de pâte

Pour mieux suivre la biotransformation du PCP dans le milieu, nous avons caractérisé les filtrats aqueux; correspondant à chaque aliquot de pâte prélevé des bioréacteurs # 2 et # 3; pour leur contenu en matière organique, en carbone inorganique de même que leur toxicité.

La première expérience de la série a consisté à déterminer le taux de variation de PCP dans la phase aqueuse (figure 4.7).

Le PCP possède la caractéristique d'être fortement absorbé dans la cellulose et il est faiblement soluble dans l'eau; quoique sa dissolution augmente avec le pH et la température (14). Les réacteurs biologiques ont été opérés dans des conditions de pH avoisinant la neutralité (pH de 6.5 à 8.5) à la température de 25 °C. Comparativement à la concentration de PCP dans la pâte, les résultats présentés à la figure 4.7, montrent une concentration beaucoup plus faible.

Tel que nous l'avons constaté avec la pâte, nous observons un taux d'élimination de PCP dans la phase aqueuse qui est élevé durant les premiers jours de biotraitement. On constate un taux de disparition de PCP de 99 % après un temps de résidence de 24 heures seulement. Il y a un ralentissement de la réaction de conversion puis une stabilisation après une semaine de traitement aérobie.

Les résultats présentés dans les figures 4.8 (bioréacteur #2) et 4.9 (bioréacteur #3), nous montrent le contenu des filtrats aqueux en matière orga-

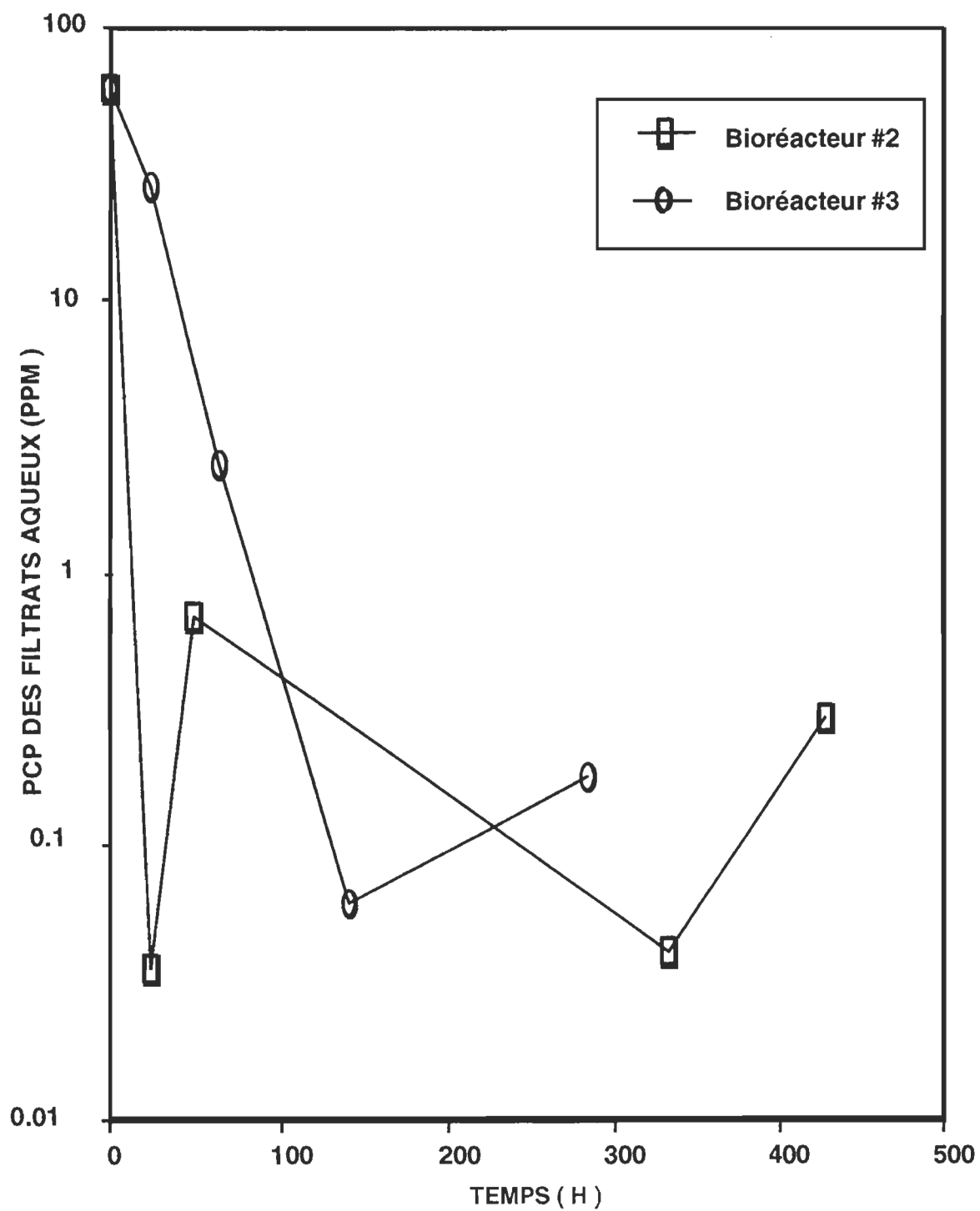


FIGURE 4.7 Variation de la concentration de PCP dans les filtrats aqueux (Bioréacteurs #2 et #3)

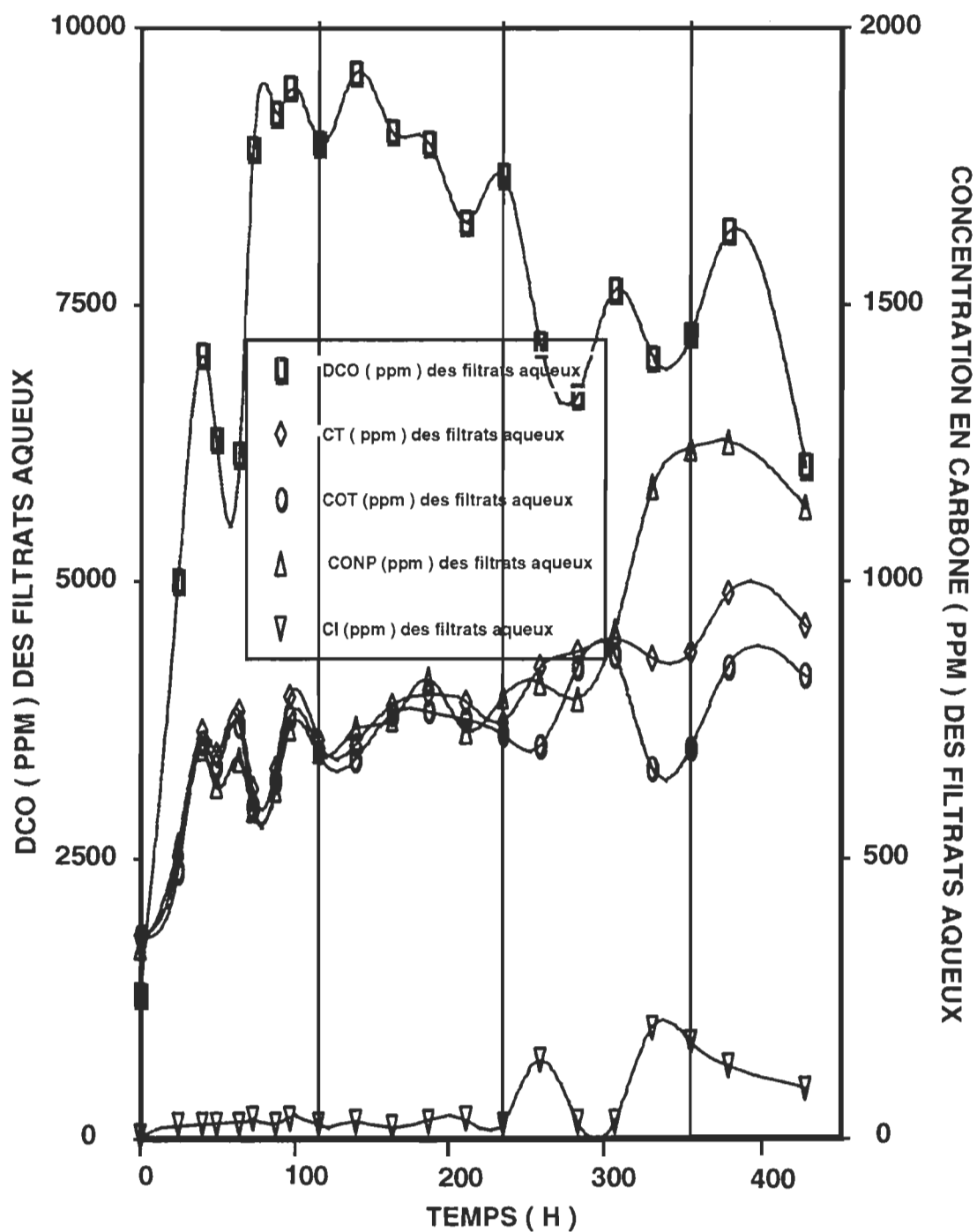


FIGURE 4.8

Constituants organiques et inorganiques
des filtrats aqueux (Bioréacteur #2)

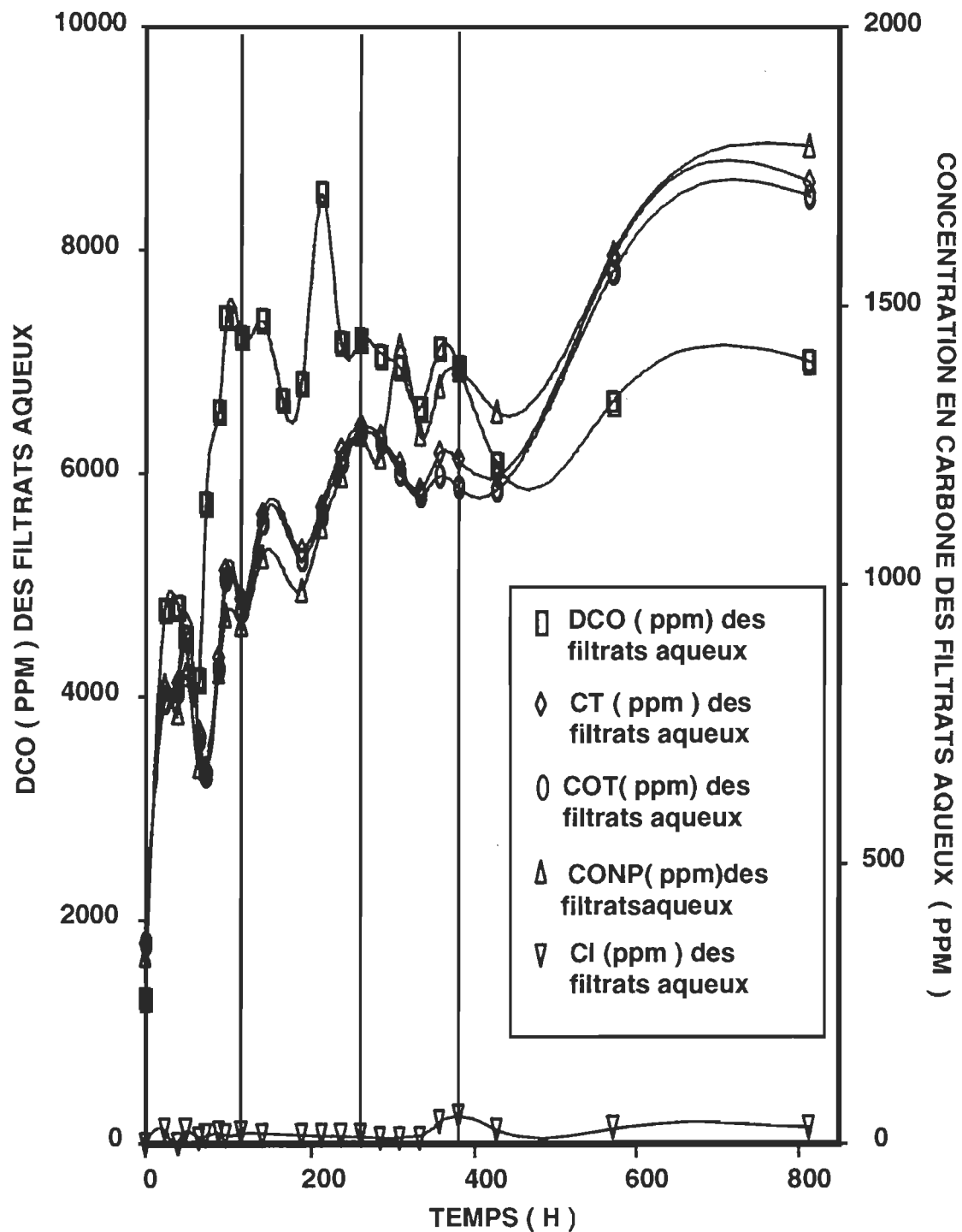


FIGURE 4.9 Constituants organiques et inorganiques des filtrats aqueux (Bioréacteur #3)

nique oxydable chimiquement; en carbone total et en carbone organique dissous (COD).

Les trois lignes verticales tracées sur chacun des graphiques correspondent au moment où on a réinoculé avec le biozyme B-52 (consortium #2), ce qui représente des intervalles de temps de cinq jours.

On peut remarquer que les concentrations de carbone total et de carbone organique total sont équivalentes, puisque la teneur en CI est très faible. Cette faible teneur en carbone minéral (bicarbonates et des carbonates) s'explique par le fait que nous avons opéré en aérobie. Le système d'aération a contribué à la libération du CO_2 dans l'atmosphère.

Les concentrations de carbone organique non purgeable sont similaires à celles du carbone organique total, parce que la portion carbone organique purgeable est inexistante. L'absence de carbone organique purgeable, est due aux conditions opératoires et d'analyse dans lesquelles le test a été effectué.

La portion de matière organique biologiquement oxydable n'a pas été représentée dans les deux figures, car la détermination de la DBO_5 a montré une grande variabilité dans les résultats. La procédure comportait une mesure de l'oxygène dissout avec une méthode électrométrique. Les résultats obtenus ont montré des quantités d'oxygène dissout très élevées, car il est possible que des gaz interférants (SO_2 , CO ,) aient traversé la membrane semi-perméable aux gaz et qu'ils aient affecté le senseur de l'électrode à oxygène (62).

Les résultats (figure 4.8, 4.9) représentent diverses portions de la matière organique. Après quelques jours de traitement il y a une hausse du

contenu organique dans la phase aqueuse. Pour cette même période, le carbone inorganique est stable et demeure faible en concentration. Après une dizaine de jours de traitement la DCO et la matière organique carbonée ont tendance à diminuer, cependant dans le cas du réacteur #2 (figure 4.8) il n'y a pas de diminution notable du COT; et parallèlement la matière inorganique carbonée augmente. Cette augmentation du contenu organique dans les filtrats s'explique dans un premier temps, par le fait que la PTM de pin gris imprégnée contient un substrat hydrophobe (l'huile de pétrole) et en second lieu, la présence de sous-produits provenant de la dégradation.

Durant leur croissance sur le substrat organique insoluble, les populations bactériennes du consortium #1 (Biozyme 2500), secrètent des émulsifiants. Ce type de composé généré par les microorganismes agit sur la solubilité du substrat et le rend ainsi disponible à la dégradation biologique (64).

En fait dans les bioréacteurs contenant la pâte thermomécanique contaminée à faible consistance, le processus se produit à l'interface huile-eau où le bioémulsifiant s'adsorbe à la phase hydrocarbonée et rend ainsi les deux milieux miscibles. En conséquence le polluant organique et son huile deviennent disponibles et leur biodégradation devient possible. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Falalko et Novak (64).

La seconde raison pouvant contribuer à la hausse de notre matière organique, est la présence de sous-produits provenant de la biodégradation du PCP. Plusieurs travaux (8,44,46,65) ont montré que la biodégradation du PCP occasionnait la formation de plusieurs métabolites hydroxylés. L'augmentation de notre matière organique confirme la présence de ce type de composés.

La biotransformation augmente la polarité du système et par conséquent une plus grande affinité pour la solution aqueuse.

Lors des inoculations répétées avec la deuxième communauté bactérienne (Biozyme B-52), l'ajout de son milieu nutritif a contribué mais de manière beaucoup moins significative, à l'augmentation de la matière organique dans la phase aqueuse.

Après 10 jours de biotraitement le contenu organique diminue alors qu'au même moment le carbone minéral augmente. Ce qui nous laisse supposer que les sous-produits de la biodégradation du PCP ont été à leur tour, biotransformés jusqu'à leur minéralisation.

Nous avons aussi effectué des bio-essais de toxicité Microtox sur la phase aqueuse. Ces essais biologiques s'avéraient inéluctables à la caractérisation des filtrats puisque nous voulions nous assurer de l'efficacité du biotraitement.

La figure 4.10 présente le niveau de toxicité (EC_{50}) de quelques filtrats aqueux provenant de pâtes prélevées après différents temps de résidence des bioréacteurs #2 et #3.

Il est à noter que, plus la EC_{50} est élevée, moins l'échantillon évalué est toxique et inversement. Donc la EC_{50} du filtrat témoin et celles des filtrats représentant différents temps de biotraitement montrent qu'ils sont tous toxiques. Cependant, le filtrat témoin est beaucoup moins toxique que tous les filtrats. Ces derniers, en plus de posséder un niveau de toxicité élevé, ce haut niveau de toxicité est constant peu importe que le temps d'incubation soit de 5 ou 15 minutes.

De façon générale, les résultats obtenus nous montrent que la phase a-

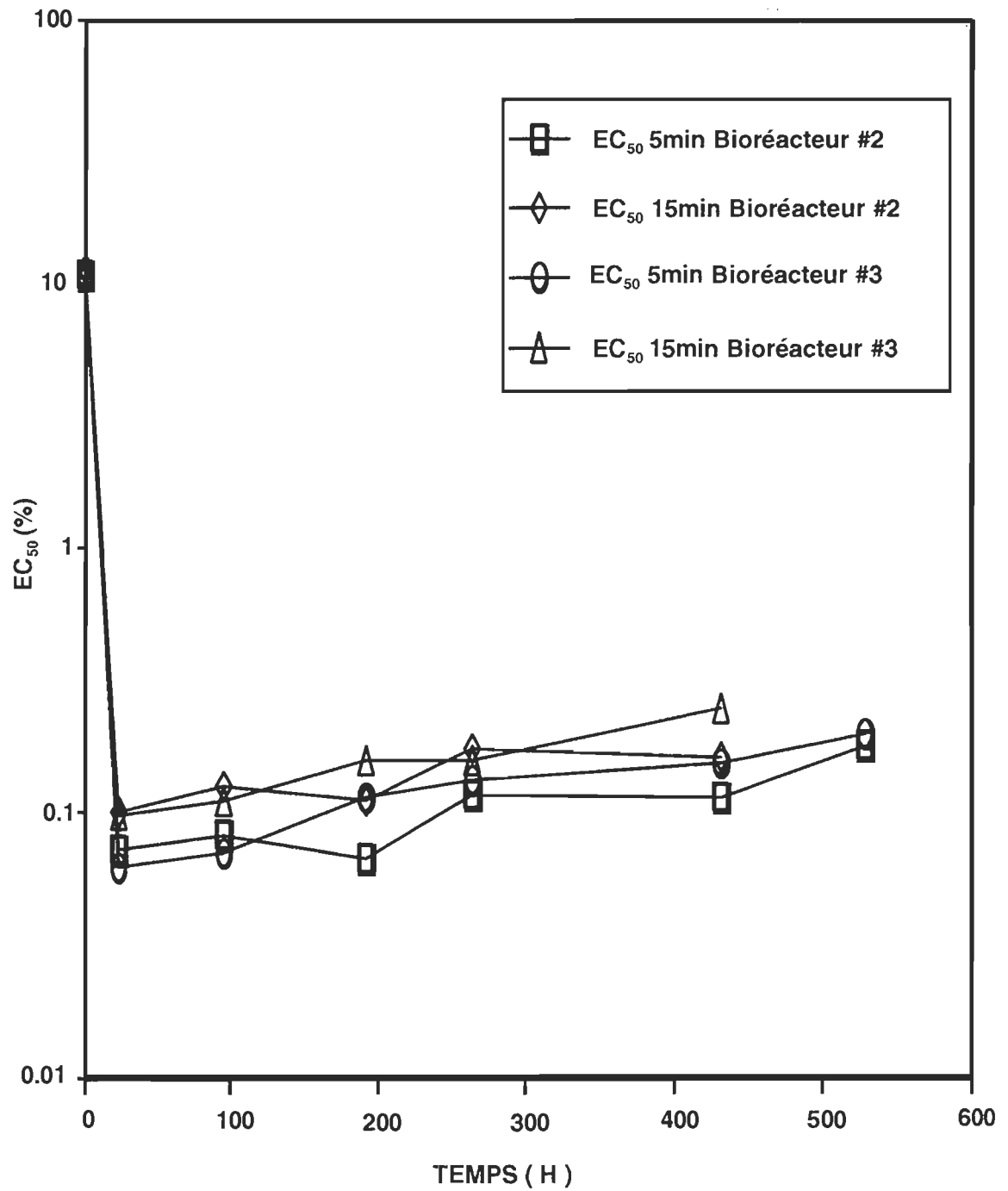


FIGURE 4.10 Toxicité des filtrats aqueux (Bioréacteurs #2 et #3)

queuse des bioréacteurs est toxique et demeure toxique, tout au long de notre étude qui correspond à environ un mois.

Les résultats présentés dans les figures 4.4, 4.5 et 4.6 nous permettent de constater une diminution du contenu en PCP, ce qui entraîne par conséquent une diminution de la toxicité de la pâte. Suite à ce processus, les métabolites générés dans le milieu ont fait en sorte que la phase liquide est devenue plus toxique (figure 4.10). Lors de notre expérimentation le test Microtox n'a pas été effectué sur les solides en suspension.

Lors d'une éventuelle mise à l'échelle du système, il serait bon, une fois la pâte dépolluée, de séparer la phase liquide de la phase solide et d'acheminer l'eau résiduaire vers un système de traitement plus adéquat pour parvenir à une épuration totale.

4.3 Blanchiment biologique d'une PTM de pin gris non imprégnée

La dernière partie du projet, nous a permis de vérifier un deuxième phénomène biotique soit le blanchiment par voie biologique d'une PTM de pin gris non imprégnée.

En plus du bioréacteur témoin, un seul bioréacteur aérobique en mode cuvée a été employé pour déterminer l'efficacité de blanchiment du consortium bactérien.

La figure 4.11 représente le niveau de blancheur ISO de la PTM de pin gris en fonction de la progression du biotraitement et le taux de biodégradation d'acides gras et résiniques contenus dans la pâte.

Les résultats obtenus sur le niveau de blancheur ISO montrent qu'il y a effectivement un gain de blancheur par processus biologique. Le comportement observé est similaire à celui observé lors du blanchiment au peroxyde ou à l'hy-

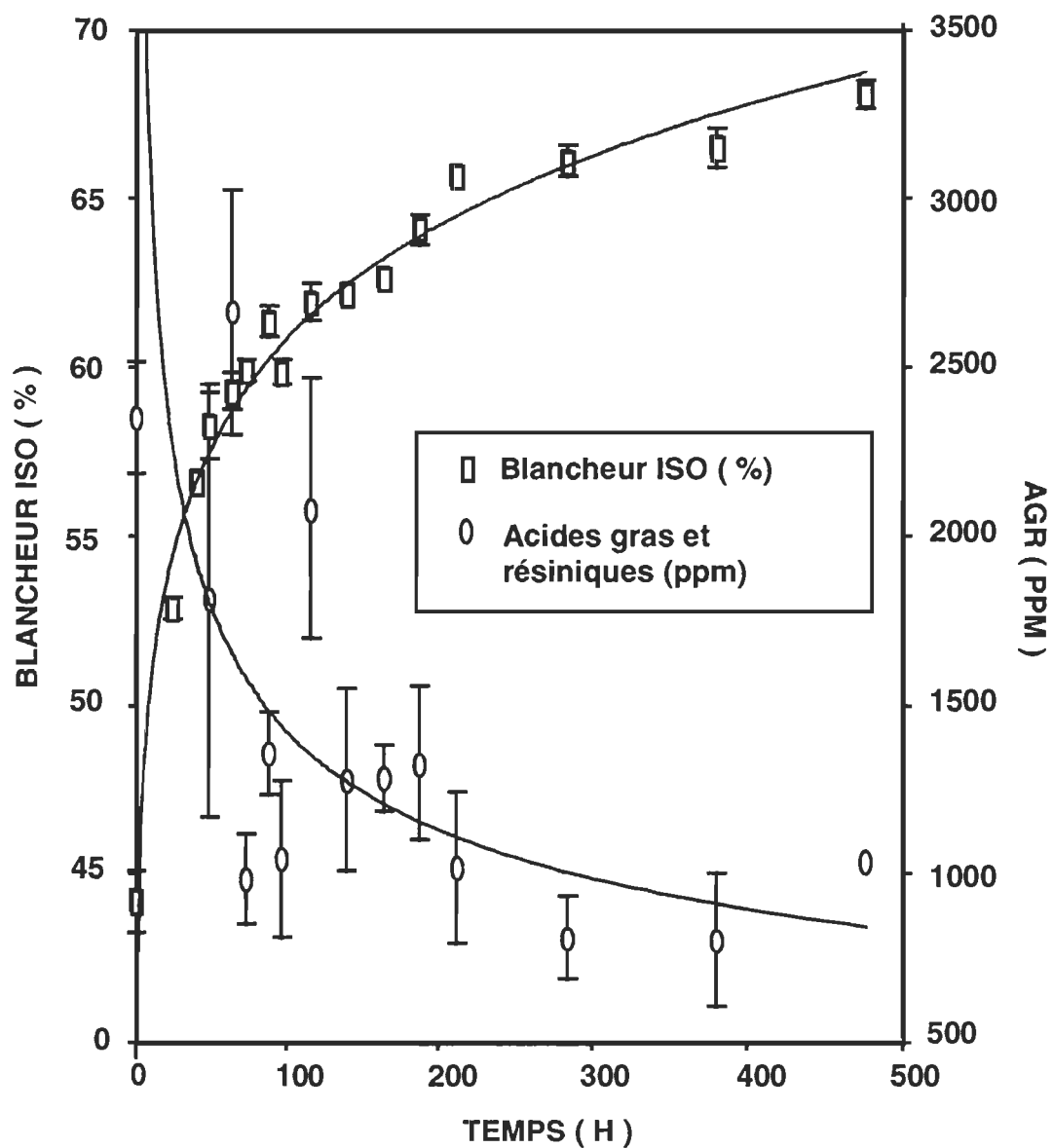


FIGURE 4.11 Blanchiment par voie biologique d'une PTM de pin gris (Bioréacteur #4)

drosulfite. Après une période de temps plus ou moins variable dépendant de l'agent utilisé on observe une stabilisation du niveau de blancheur.

D'une blancheur initiale de 44 % ISO, on atteint un gain de blancheur de 24 points ISO, après un temps de résidence d'une douzaine de jours; ce qui correspond à une PTM semi-blanchie. C'est un niveau de blancheur suffisant pour des pâtes nécessaires par exemple à la fabrication de papier journal ou encore de certains cartons.

Parallèlement aux essais optiques, nous avons vérifié la teneur d'un des groupes de composés responsables en partie d'une hausse de blancheur, lorsqu'ils sont modifiés dans leurs structures ou éliminés de la PTM. Nous nous sommes donc attardés aux acides gras et résiniques qui font partie des matières extractibles présentes dans la pâte.

La figure 4.11 illustre qu'il y a possibilité d'une relation entre une hausse de blancheur et la réduction en acides gras et résiniques. Notre augmentation de blancheur peut être également attribuable à l'enlèvement des matières extractibles.

La concentration des acides gras et résiniques, montre qu'il y a un taux de biodégradation de ceux-ci de 42 % après un temps d'action de 3.5 jours et après 20 jours de biotraitement le taux d'enlèvement des extraits se totalise à 56 %. Il est à noter que le taux de réduction des acides résiniques est plus important que celui des acides gras (tableau 4.3).

Cette approche d'utilisation du biotraitement nous permet de blanchir une pâte sans l'emploi de produits chimiques qui éventuellement se retrouveraient dans l'eau résiduelle et de présenter une solution alternative au problème de la poix rencontré dans les fabriques papetières.

TABLEAU 4.3 Les concentrations en acides gras et en acides résiniques après différents temps de biotraitement

<i>échantillons</i>	<i>concentration en acides gras (ppm)</i>	<i>concentration en acides résiniques (ppm)</i>
pâte témoin	114	2236
pâte biotraitée 3.5 jours	108	1250
pâte biotraitée 20 jours	89	945

La présence de fortes concentrations d'acides gras et résiniques dans le pin gris limite actuellement son utilisation dans les diverses formulations de papier ou de carton.

On constate que le biotraitement d'une PTM de pin gris permettrait de maximiser l'utilisation de cette essence dans l'industrie papetière.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Nos résultats montrent qu'il est possible de biodécontaminer des vieux poteaux de lignes téléphoniques imprégnés au PCP, en appliquant un traitement biologique sur le bois traité lorsque celui-ci est à l'état de pâte.

Une réduction de la quantité de biomasse et de nutriments nous a permis de maintenir la performance de notre système bactérien et ce, pour une période de temps raisonnable.

Nos travaux ont tenu compte de deux facteurs en vue d'une application future du système:

- 1) Rendement
- 2) Temps de biotraitement

Les résultats obtenus sur la biodégradabilité du PCP nous permettent de passer à l'échelle pilote.

La deuxième partie de notre expérimentation nous a permis de constater qu'il est possible de blanchir une pâte thermomécanique de pin gris par voie biologique. Nous obtenons un double avantage car parallèlement au phénomène de blanchiment, il se produit une dégradation biologique des acides gras et résiniques. Un gain de 24 points du niveau de blancheur est donc possible tout en ayant une réduction de 65 % des acides gras et résiniques.

Le traitement biologique apporte l'avantage de réduire l'utilisation de produits chimiques de blanchiment, tandis que la biodégradation des acides gras et résiniques permettrait à l'industrie papetière de maximiser l'utilisation de la PTM de pin gris dans leurs produits finis.

La décontamination par l'utilisation de microorganismes est une des voies intéressantes qui offre la possibilité de *réutiliser* un *déchet dangereux* en

devenant une *ressource potentielle* dans le domaine de la fabrication du papier journal ou du carton.

CHAPITRE VI

BIBLIOGRAPHIE

1. Domtar, "Pentachlorophénol", Fiche technique, Montréal, Canada, pp.1-10 (1986).
2. Jones, P.A., "Chlorophenols and their impurities in the Canadian environment", Ottawa, Environment Canada, 434 pp.,(Report No. EPS 3-EC-81-2)(1981).
3. Crosby, D.G., Beynon, K.I., Greve, P.A., Korte, F., Still, G.G., Vouk, J.W., "Environmental chemistry of pentachlorophenol", Pure appl. Chem. 53: 1051-1080 (1981).
4. Wallis-Taylor, A.J., "The preservation of wood", William Rider and Son LTD., Londres, Angleterre (1925).
5. Broese van Groenou, H., Rischen, H.W.L., Van der Berge, J., "Wood preservation during the Past 50 Years", A.W. Sijthoff's Uitgeversmaatschappij, Leiden, Hollande (1951).
6. Atlas, R.M., Bartha, R., "Microbial ecology fundamentals and applications", 3^e éd., The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.California, U.S.A., pp.44-417 (1992).
7. MacBain, A., Paterson, A., Salkinoja-Salonen, M., Senior E., "Ecological factors in the microbial degradation of 4-chloro-2-methyl phenoxyacetic acid (MCPA) and pentachlorophenol (PCP)", Journal of chemical technology and biotechnology 51 (2): 280-281 (1991).

8. Schenk, T., Müller, R., Mörsberger, F., Otto, M.K., Lingens, F., "Enzymatic dehalogenation of pentachlorophenol by extracts from *Arthrobacter* sp. strain ATCC 33790", *Journal of bacteriology* 171 (10): 5487-5491 (1989).
9. Ingram, L.L., McGinnis, G.D., Gjovik, L.R., "Studies on the vaporization of pentachlorophenol from treated Wood", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 15: 669-676 (1986).
10. Kudo, A., "Decomposition of pentachlorophenol by anaerobic digestion", *Wat. Sci. Tech.* 21: 1685-1688 (1989).
11. Hendriksen, H.V., Larson, S., Ahring, B.K., "Anaerobic degradation of PCP and phenol in fixed-film reactors: the influence of an additional substrate", *Wat. Sci. Tech.* 24 (3/4): 431-436 (1991).
12. Konasewish, D.E., Henning, F.A., "Installations de préservation du bois au pentachlorophénol (PCP)". *Recommandations techniques pour la conception et l'exploitation*, Approvisionnement et Services Canada, Environnement Canada, Ottawa, pp. 1-40 (1988).
13. Rao, K.R., "Pentachlorophenol. Chemistry, pharmacology, and environmental toxicology", K. Ranga Rao, Plenum Press, New York, U.S.A., pp. 68-357 (1978).
14. IPCS International Programme on Chemical Safety, "Environmental health criteria 71 pentachlorophenol", Genève, World Health Organization, pp. 11-66 (1987).
15. Williams, P., "Pentachlorophenol, an assessment of the occupational hazard", *Am. Ind. Assoc. J.* 43: 799-810 (1982).

16. Steiert, J.G., "Bacterial catabolism of pentachlorophenol" , Ph. D. Thesis, Univ. Min.,Etats-Unis (1987).
17. Nilsson, C.A., Norstrom, A., Andersson, K., Rappe, C., "Impurities in commercial products related to pentachlorophenol. In Rao, K.R., ed., "Pentachlorophenol: chemistry, pharmacology, and environmental toxicology", New York, London, Plenum Press, pp.313-324 (1978).
18. Cessna, A.J., Grover, R., "Spectrophotometric determination of dissociation constants of selected acidic herbicides", J. Agric. Food Chem. 26: 289-292 (1978).
19. Dupont, R.R., McLean, J.E., Hoff, R.H., William, M.M., "Evaluation of the use of solar irradiation for the decontamination of soils containing wood treating wastes", J. Air Waste Manage. Assoc. 40: 1257-1265 (1990).
20. Morgan, J.W.W., Purslow, D.F., "Volatile losses of wood preservatives. In: Proceedings of the 23rd annual Convention of the BWPA, British Wood Preservers Association, pp. 173-193 (1973).
21. Petrowitz, H.J., "Volatilisation of the active ingredients of wood preservatives from chemically protected timber. In: Research report of the Expert Group on biological materials research", Berlin, Federal Institute for materials Research, pp. 1-32 (1981).
22. Gilbert, R., Besner, A., Tétreault, P., Labrecque, J.F., "Le double défi de conserver et de graver les poteaux de bois", Hydro-Tech 9 (1): 11 (1993).
23. Kirsch, E.J., Etzel, J.E., "Microbial decomposition of pentachlorophenol", Journal W.P.C.F. 45 (2): 359-364 (1973).

24. Apajalahti, J.H.A., Salkinoja-Salonen, M.S., "Degradation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenicus* ", Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 62-67 (1986).
25. Carraway, J.W., Doyle, J.R., "Innovative remedial action at a wood-treating Superfund site", TAPPI J. 74 (7): 113-118 (1991).
26. Edgehill, R.U., Finn, R.K., "Microbial treatment of soil to remove pentachlorophenol ", Appl. Environ. Microbiol. 45 (3): 1122-1125 (1983).
27. Gonzalez, J.F., Hu, W.S., "Effect of glutamate on the degradation of pentachlorophenol by *flavobacterium* sp. ", Appl. Microbiol. Biotechnol. 35 (1): 100-104 (1991).
28. Lu, C.J., Speitel, G.E., "Effect of natural organic matter on biodegradation of a recalcitrant synthetic organic chemical", Am. Water Works Assoc. J. 83 (2):56-61 (1991).
29. Peprna, I., Kamali, K., Robinson, C.W., Mortimer, W.P., Allen, D.G., "Biodegradation of pentachlorophenol in treated wood extract by *Arthrobacter* sp. and *Flavobacterium* sp.", Résumé de communications, 44ème Congrès de Canadian Society for Chemical Engineering, Calgary, Canada, Convention Center, 2-5 octobre (1994).
30. Saber,D.L., Crawford, R.L., "Isolation and characterization of *Flavobacterium* strains that degrade pentachlorophenol", Appl. Environ. Microbiol. 50 (6):1512-1518 (1985).
31. Stanlake ,J.G., Finn, R.K., "Isolation and characterization of a pentachlorophenol-degrading bacterium", Appl. Environ. Microbiol. 44 (6): 1421-1427 (1982).

32. Tranvik, L., Larsson, P., Okla, L., Regnell, O)., "In situ mineralization of chlorinated phenols by pelagic bacteria in lakes of differing humic content ", *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 195-200 (1991).
33. Brown, E.J., Pignatello, J.J., Martinson, M.M., Crawford, R.L., "Pentachlorophenol degradation: a pure bacterial culture and an epilithic microbial consortium ", *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (1): 92-97 (1986).
34. Klecka, G.M., Maier, W.J., "Kinetics of microbial growth on pentachlorophenol ", *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1): 46-53 (1985).
35. Siahpush, A.R., Lin, J.E., Wang, H.Y., "Effect of adsorbents on degradation of toxic organic compounds by coimmobilized systems", *Biotechnol. Bioeng.* 39 (6): 619-628 (1992).
36. Duff, S.J.B., Kennedy, K.J., Brady, A., "Treatment of dilute phenol-polychlorophenol wastewaters using upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors", *Water Research* 29 (2): 645-651(1995).
37. Godsy, E.M., Goerlitz, D.F., Ehrlich, G.G., "Effects of pentachlorophenol on methanogenic fermentation of phenol", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 271-277 (1986).
38. Hendriksen, H.V., Ahring, B.K., "Metabolism and kinetics of pentachlorophenol transformation in anerobic granular sludge", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 662-666 (1992).
39. Mikesell, M.D., Boyd, S.A., "Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms ", *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (4): 861-865 (1986).

40. Lamar, R.T., Glaser, J.A., Kirk, T.K., "Fate of pentachlorophenol (PCP) in sterile soils inoculated with the White- Rot Basidiomycete *Phanerochaete Chrysosporium*: mineralization, volatilization and depletion of PCP", *Soil Biol. Biochem.* 22(4): 433-440 (1990).
41. Mileski, G.J., Bumpus, J.A., Jurek, M.A., Aust, S.D., "Biodegradation of pentachlorophenol by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* ", *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (12): 2885-2889 (1988).
42. Moos, L.P., Kirsch, E.J., Wukasz, R.F., Grady, C.P.L., "Pentachlorophenol biodegradation-1 aerobic ", *J. Water Res.* 17 (11): 1575-1584 (1983).
43. Autenrieth, R.L., Bonner, J.S., Akgerman, A., Okaygun, M., McCreary, E.M., "Biodegradation of phenolic wastes" *J. Hazard Mater* 28: 29-53 (1991).
44. Apajalahti, J.H.A., Salkinoja-Salonen, M.S., "Dechlorination and para-hydroxylation of polychlorinated phenols *Rhodococcus chlorophenolicus*", *J. Bacteriol.* 169: 675-681 (1987).
45. Reiner E.A., Chu, J., Kirsch, E.J., "Microbial metabolism of pentachlorophenol", pp. 67-81. In Rao, K.R., ed.), "Pentachlorophenol: chemistry, pharmacology and environmental toxicology", Plenum Publishing Corp., New York (1978).
46. Steiert, J.G., Crawford, R.L., "Catabolism of pentachlorophenol by a flavobacterium sp.", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141: 825-830 (1986).

47. Liu, D., Pacepavicius, G., "A systematic study of the aerobic and anaerobic biodegradation of 18 chlorophenols and 3 cresols", *Toxicity Assessment: An International Journal* 5: 367-387 (1990).
48. Liu, D., Maguire, R.J., Pacepavicius, G., Dutka, B.J., "Biodegradation of recalcitrant chlorophenols by cometabolism.", *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6 (1): 85-95 (1991).
49. Crosby, D.G., "Environmental chemistry of pentachlorophenol", *Pure Appl. Chem.* 53: 1051-1080 (1981).
50. Williams, A.I., "The separation and determination of pentachlorophenol in treated softwoods and preservative solutions", *Analyst* 96: 296-305 (1971).
51. Secchieri, M., Benassi, C.A., Pastore, S., Semenzato, A., "Rapid pentachlorophenol evaluation in solid matrixes by second derivative UV spectroscopy for application to wood leather samples", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74 (4): 674-678 (1991).
52. McDonald, K.L., "Determination of tetra- and pentachlorophenol in wood by ion exchange and HPLC", *Journal of Chromatographic Science* 22: 293-295 (1984).
53. Gostik, N.A., "The nutrient requirements in biological effluent treatment", *Paper Technology*. 8. 33-35 (1990).
54. Mueller, J.G., Lantz, S.E., Blattman, B.O., Chapman, P.J., "Bench-scale evaluation of alternative biological treatment processes for the remediation of pentachlorophenol- and creosote- contaminated materials:

- solid-phase bioremediation", Environ. Sci. Technol. 25 (6): 1045-1054 (1991).
55. Snyder, W.D., "Fast injection with the HP 7673 A automatic injector: chemical performance", Hewlett-Packard Company, technical paper no. 108, Publication number (43) 5953-1843, Mai I(1985).
 56. Firor, R.L., "Improved analysis of polar and high boiling range materials with the HP 5890 Series II on-column inlet", Hewlett-Packard Company, Application note 228-85, Publication Number(43) 5091-6971E, June (1989)
 57. Hite, S., Feyerherm, F., Doherty, L., "Semi-volatile environmental analysis using 2 μ l splitless injections with electronic pressure control(EPC)", Hewlett-Packard company, MS application note, Publication number (23) 5091-6949E, Mars (1993).
 58. Voss, R.H., Rapsomatiotis, A., "An improved solvent extraction based procedure for the gas chromatographic analysis of resin and fatty acids in pulp mill effluents", Journal of Chromatography 346: 205-2145 (1985).
 59. Lee, H.-B., Peart, T.E., "Determination of resin and fatty acids in sediments near pulp mill locations", Journal of chromatography 547: 315-323 (1991).
 60. Lee, H.B., Weng, L-D., Chau, A.S.Y., "Chemical derivatization analysis of pesticide residues. VIII. Analysis of 15 chlorophenols in natural water by in situ acetylation ", J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67 (4): 789-794 (1984).

61. Chang, I.L., Sanders, W.J., "Effects of vial septa used in the GC/ECD analysis of trace organics", Hewlett-Packard company, Application note 228-244, Publication number (43) 5091-8980E, octobre (1993)
62. Tardat-Henry, M., Beaudry, J.P., "Chimie des eaux", Le griffon d'argile inc., Québec, Canada (1984).
63. Degrémont, "Memento technique de l'eau", Tome 1 et 2, 9è éd., Lavoisier-Technique et Document, Paris, France, 1459 pp.(1989).
64. Falalko, D.M., Novak, J.T., "Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons", Water Environment Research 64 (2): 163-168 (1992).
65. Suzuki, T., "Metabolism of pentachlorophenol by a soil microbe", J. Environ. Sci. Health B12: 113-127 (1977).